

**FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

Departamento de Medicina



**“ BÚSQUEDA DE PATRONES CLÍNICOS Y MOLECULARES EN ALERGIA A
FRUTOS SECOS”**

**Tesis Doctoral
Elisa Haroun Díaz
Madrid, 2018**

Vº Bº Director/Codirector de Tesis:

Dr. Javier Cuesta Herranz

Tutor de Tesis:

Dr. Joaquín García Cañete

A mi madre, a mi hermano y a Guille

“ Elige un trabajo que te guste y no tendrás que trabajar ni un día de tu vida”

Confucio



D. Javier Cuesta Herranz, Facultativo especialista del Servicio de Alergología del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz y D. Joaquín García Cañete, Profesor Titular de la Universidad Autónoma de Madrid y Facultativo especialista del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz,

CERTIFICAN

Que Doña Elisa Haroun Díaz, Licenciada en Medicina y Cirugía por la Universidad de Alcalá de Henares, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado " Búsqueda de patrones clínicos y moleculares en alergia a frutos secos" que presenta como Tesis Doctoral para alcanzar el grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste, firmamos la presente en Madrid a 5 de Noviembre de 2018.

Fdo.: Dr. Javier Cuesta Herranz

Dr. Joaquín García Cañete

La interesada

Elisa Haroun Díaz

AGRADECIMIENTOS

A Javier Cuesta, por su paciencia, y porque sin él nada de esto hubiera sido posible.

A Joaquín García Cañete, por ser un gran tutor.

A Mayte Villalba, por su colaboración tan importante en este trabajo.

A Manuel de las Heras, por compartir conmigo sus pacientes.

A María Eulalia Landívar, por pasar muchos de sus “salientes” conmigo.

A Carlos Pastor, Aroa Sanz, Ignacio Mahillo, Ben Bartley y a Xavi Baz por sus correcciones.

A Francisco García Cabrera, por compartir conmigo su maravilloso “endnote”.

A Gabriela Canto, por sus sabios consejos, confiar en mí y seguir enseñándome cada día.

A María Vázquez y a Natalia Blanca por sus ánimos constantes y por darle conmigo tantas vueltas a los gráficos y tablas de este trabajo.

A todos los miembros del Servicio de Alergia del Hospital FJD e Infanta Leonor.

A Esther, por su gran ayuda, por dedicarme su tiempo y por llegar conmigo hasta el final, una gran compañera y amiga.

A mis mejores amigos, que durante tantos años me han apoyado en todo momento, especialmente a Juana Del Cañizo Canto y a Laura Prieto por darme tranquilidad cuando la necesito.

Finalmente, a mi familia:

A mi padre, porque ignorando sus consejos escogí esta profesión.

A mi madre y a mi hermano, por aguantar mi genio y sufrir conmigo en este largo camino sin perder la sonrisa.

A la familia de Guille.

A Guille, por quererme incondicionalmente y por ser tan comprensivo al prescindir de nuestro tiempo juntos para dedicarme a este trabajo.

ABREVIATURAS

AINEs: Antiinflamatorios no esteroideos

CBS: cistationina beta-sintasa

CCDs: Determinantes de carbohidratos

EAACI: European Academy of Allergy and Clinical Immunology

ECL: Sistema de detección por Quimioluminiscencia

EEUU: Estados Unidos

ELISA: Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzima

GLP: Germinas (germin-like proteins)

HEP: Unidad de punción histamina equivalente

HCl: Ácido Clorhídrico

HRP: Peroxidasa de rábano

IgE: Inmunoglobulina IgE

IgG: Inmunoglobulina G

IUIS: WHO-International Union of Immunological Societies

kDa: Kilodalton

MALDI-TOF: Espectrometría de masas de absorción ionización por láser asistida por matriz. Tiempo de vuelo

MS: Espectrometría de Masas

NIAID: Instituto Nacional de Alergia y enfermedades infecciosas

nm: Nanómetro

nsLTPs: Proteínas de transferencia de lípidos

Prot: Proteína

RC: Reactividad cruzada

SAO: Síndrome de alergia oral

SEAIC: Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio

SPPT: Skin prick-prick test

SPT: Skin prick-test

SS: Síntomas sistémicos

RP-HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa

TA: Temperatura ambiente

TLP: Taumatinas (thaumatin-like proteins)

β ME: β -mercaptoetanol

RESUMEN

Introducción: Los frutos secos son el segundo grupo de alimentos que con mayor frecuencia produce reacciones alérgicas, siendo responsables de producir reacciones graves. La evitación es en la actualidad el tratamiento de elección para este grupo de pacientes siendo esto especialmente difícil por ser alérgenos ocultos. Esto sumado a la mala calidad de los extractos, la atopia latente así como por la reactividad cruzada existente entre ellos, dificulta considerablemente el diagnóstico y manejo de estos pacientes. La incorporación del diagnóstico molecular ha supuesto un gran avance en el diagnóstico y en el manejo de estos pacientes.

Objetivos: Determinar las características de la alergia a frutos secos en Madrid para estudiar los que con mayor frecuencia producen alergia, determinar las características clínicas, definir los patrones moleculares de sensibilización, así como estudiar las correlaciones entre las sensibilizaciones a nivel molecular. Realizar una búsqueda de patrones diferenciales según localización geográfica y por último describir nuevas entidades en alergia a frutos secos.

Métodos: Se estudiaron 83 pacientes con alergia a frutos secos procedentes del Servicio de Alergia del Hospital Fundación Jiménez Díaz (Madrid) y del Hospital Universitario Central de Asturias siguiendo los criterios diagnósticos del comité de alergia a alimentos de la SEAIC. Se analizaron las características clínicas de los pacientes, la sensibilización a frutos secos y se estudió el patrón molecular de sensibilización (IgE), tanto en técnica de ImmunoCAP como de ISAC.

Resultados: Los frutos secos más frecuentemente implicados en producir síntomas de alergia en Madrid fueron la nuez (65,3%) avellana (57,1%), cacahuete (46,9%) y la almendra (42%). Produjeron con mayor frecuencia síntomas sistémicos, siendo la nuez el responsable de la mayoría de ellos. El patrón nsLTP fue predominante en esta región (71,4%-Pru p 3, 61,2%-Ara h 9 y 44,9%-Cor a 8) seguido de Bet v 1 (12%) y detectándose además una alta correlación entre nsLTPs siendo moderada para Tri a 14 e indetectable para Par j 2. Sin embargo, en Asturias el porcentaje de sensibilización a nsLTP y a Bet v 1 fue similar (46,4%-Pru p 3 y 42,9%-Bet v 1) siendo Bet v 1 el alérgeno dominante en alergia a avellana (56,2%) y nsLTP en alergia a cacahuete (61,5%). Detectamos un grupo

de pacientes con alergia exclusiva a pistacho y anacardo con ausencia de IgE específica y tolerancia al resto de frutos secos, cuya base molecular fue la sensibilización exclusiva a albúminas 2S de ambos frutos secos con reactividad cruzada entre ellas y ausencia de ésta con otras albúminas 2S no pertenecientes a esta familia.

Conclusiones: Nuez, avellana, cacahuete y almendra son los frutos secos que con mayor frecuencia producen alergia en nuestros pacientes. En Madrid, el patrón molecular estuvo dominado por sensibilización a nsLTPs existiendo una elevada correlación entre ellas.

Encontramos un perfil diferencial de sensibilización en alergia a frutos secos en la región de Asturias, repartido entre nsLTP y proteínas PR-10. El patrón cambió dependiendo del fruto seco evaluado. En alergia a avellana un patrón PR-10, en cacahuete nsLTP y nuez un patrón mixto.

Por último, definimos el síndrome Pistacho-Anacardo y demostramos la escasa o nula reactividad cruzada entre distintas albúminas 2S excepto entre las pertenecientes a la misma familia taxonómica (*Anacardiaceae*).

SUMMARY

Scope-Background: Tree nuts are considered the second cause of food allergies and are responsible for severe allergic reactions. Avoidance is currently the first line of treatment for these patients, however this is very difficult because they are hidden allergens. In addition with the poor quality of extracts, the latent atopy and the cross-reactivity existing between them, the diagnosis and management is very complicated. The incorporation of molecular diagnosis has made great progress and advance in the diagnosis and management of these patients.

Objectives: To determine the characteristics of tree nut allergy in Madrid in order to study the nuts that most frequently produce allergic reactions as well as the clinical characteristics, define the molecular patterns of sensitization in nut allergy, and study the correlations between the molecular sensitizations. Search for differential patterns according to geographical location and finally describe new entities in nut allergy.

Methods: A total of 83 patients with nut allergy from Fundación Jiménez Díaz Hospital (Madrid) and from the University Central Hospital of Asturias were evaluated according to the Food Adverse Reaction Committee of Sociedad Española de Alergia e Inmunología Clínica. Clinical characteristics, tree nut sensitization and molecular patterns sensitization with ImmunoCAP and ISAC techniques were studied.

Results: The most frequent nuts eliciting allergy in Madrid were walnut (65,3%), hazelnut (57,1%), peanut (46,9%) and almond (42%). Patients that experienced more often systemic reactions were with walnut which elicited systemic symptoms in a larger universe of patients. On evaluating the pattern of sensitization Pru p 3 was 71,4% followed by Ara h 9 (61,2%), Cor a 8 (44,9%) and Bet v 1 (12%). In addition, a high correlation between nsLTPs were detected, moderate for Tri a 14 and undetectable for Par j 2. However, the patient group from Asturias, 46,4% were sensitized to Pru p 3 and 42,9% to Bet v 1. Bet v 1 was the predominant allergen involved among hazelnut-allergic patients (56,2%), while nsLTP was more common in peanut-allergic patients (61,5%). We detected a group of patients with an exclusive pistachio and cashew allergy with no specific IgE detection and tolerance to other nuts. They had an exclusive sensitization to

2S albumins of both nuts with demonstrated cross-reactivity between them but not with other 2S albumins not belonging to their family.

Conclusions: Walnut, hazelnut, peanut and almond were the most frequent nuts eliciting allergy in Spain. In Madrid, an nsLTP pattern was predominant and a high correlation between nsLTPs was detected. However, a mix of nsLTP and Bet v 1 sensitization highlighted the pattern in Asturias region and the pattern changed depending on the nut evaluated. A predominant PR-10 pattern was in hazelnut allergy, a nsLTP to peanut and a mixed pattern to walnut allergy.

We defined Pistachio-Cashew Syndrome and demonstrated the absence of cross-reactivity between different 2S Albumins with taxonomical relationship (*Anacardiaceae*).

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS

SUMMARY..... ix

ÍNDICE xi

1. INTRODUCCIÓN..... 15

1.1. Alergia a alimentos 17

1.2. Alergia a alimentos de origen vegetal 17

1.3. Sintomatología de la alergia a alimentos..... 18

1.4. Diagnóstico de la alergia a alimentos 19

1.5. Alérgenos de origen vegetal 19

1.5.1 Proteínas protectoras o proteínas de defensa..... 20

1.5.2 Proteínas estructurales 23

1.5.3 Proteínas de almacenamiento 25

1.6 Reactividad cruzada de la alergia a alimentos 29

1.7 Alergia a pólenes-alimentos vegetales 30

1.7.1 Alergia a pólenes-melocotón en Europa 31

1.7.2 Alergia a pólenes-frutos secos en Europa 32

1.8 Tratamiento de la alergia a alimentos 32

1.9 Alergia a frutos secos 32

1.9.1 Almendra..... 33

1.9.2 Avellana 35

1.9.3 Piñón 36

1.9.4 Pistacho 37

1.9.5 Anacardo 38

1.9.6 Castaña 40

1.9.7 Semilla de girasol.....	41
1.9.8 Nuez	42
1.9.9 Cacahuete	43
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	47
2.1. Hipótesis.....	49
2.2. Objetivos	49
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	51
3.1 Diseño del estudio.....	53
3.2 Selección de pacientes	54
3.2.1 Criterios de inclusión	54
3.2.2 Criterios de exclusión.....	55
3.3 Extracción sanguínea y conservación de muestras	55
3.4 Cuestionario clínico-epidemiológico	55
3.5 Pruebas cutáneas (SPT y SPPT)	57
3.6 Determinación de IgE específica mediante ImmunoCAP.....	58
3.7 Determinación de IgE específica a un panel de alérgenos purificados por microarray	59
3.8 Pruebas de provocación	59
3.9 Preparación de extractos de alimentos para purificación de albúminas 2S.....	60
3.10 Purificación de albúminas 2S.....	60
3.11 Identificación de albúminas 2 S mediante espectrometría de masas	61
3.12 Procedimientos analíticos o Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	61
3.13 Ensayos inmunológicos o ensayos de Inmunodetección	62
3.14 IgE directo y ELISA inhibición	62
3.15 Análisis estadístico	63
4. RESULTADOS	65
4.1 FASE I: Características de la alergia a frutos secos en Madrid	67

4.1.1 Pacientes.....	67
4.1.2 Cuestionario clínico-epidemiológico	67
4.1.3 Pruebas cutáneas	72
4.1.4 Determinación de IgE específica.....	75
4.1.4.A ImmunoCAP.....	75
4.1.4.B Microarray	77
4.1.4.C Estudio de correlaciones	80
4.2 FASE II: Búsqueda de patrones geográficos diferenciales en alergia a frutos secos en España	86
4.2.1 Pacientes.....	86
4.2.2 Cuestionario clínico-epidemiológico	86
4.2.3 Pruebas cutáneas	91
4.2.4 Determinación de IgE específica mediante ImmunoCAP.....	95
4.3 FASE III: Búsqueda de nuevos patrones de alergia a frutos secos: Síndrome pistacho-anacardo	98
4.3.1 Pacientes.....	98
4.3.2 Características clínicas	98
4.3.3 Pruebas cutáneas con pistacho y anacardo	98
4.3.4 Determinación de IgE específica (ImmunoCAP).....	99
4.3.5 Detección de proteínas IgE reactivas en extractos de pistacho y anacardo.....	99
4.3.6 Identificación y caracterización de albúminas 2S en extractos de pistacho y anacardo	100
4.3.7 Capacidad de unión y reactividad cruzada de las proteínas IgE	101
5. DISCUSIÓN	105
5.1 FASE I: Características de la alergia a frutos secos en Madrid	110
5.1.1 Pacientes.....	110
5.1.2 Alergia a polen	111
5.1.3 Síntomas con frutos secos, así como con otros alimentos vegetales	111

5.1.4 Tiempo de latencia de las reacciones. Cantidad mínima causante de la reacción....	114
5.1.5 Requerimiento de tratamiento ambulatorio.....	114
5.1.6 Implicación de cofactores.....	114
5.1.7 Pruebas cutáneas	115
5.1.8. ImmunoCAP	117
5.1.9. ISAC.....	118
5.1.10 Estudio de correlaciones.....	119
5.2 FASE II: Búsqueda de patrones geográficos diferenciales en alergia a frutos secos en España	121
5.3 Fase III: Búsqueda de nuevos patrones de alergia a frutos secos: Síndrome Pistacho-Anacardo	123
BIBLIOGRAFÍA.....	131
ANEXOS	153
ANEXO 1. Consentimiento Informado	154
ANEXO 2. Cuestionario de alergia a alimentos vegetales	156
ANEXO 3. Niveles de IgE específica (ImmunoCAP).....	160
ANEXO 4. Trabajos realizados durante la tesis doctoral	164
ANEXO 5. Trabajos publicados relacionados con la tesis doctoral	165



1. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.1. Alergia a alimentos

La NIAID (Instituto Nacional de Alergia y enfermedades infecciosas) define la alergia alimentaria como aquella reacción adversa de base inmunológica, a diferencia de las intolerancias alimentarias, en las que no es posible demostrar la presencia de un mecanismo inmunológico (1) . Las más frecuentes y mejor conocidas son las reacciones mediadas por anticuerpos IgE.

A pesar de que existen datos de que la prevalencia de alergia a alimentos está aumentando en países industrializados (2), en la actualidad sigue siendo difícil determinar la prevalencia e incidencia real de la alergia a alimentos. Existen diferentes causas que dificultan la comparación entre los estudios existentes como las definiciones variables de alergia alimentaria o la imposibilidad de la comparación entre estudios por la existencia de diferencias en el diseño y en los instrumentos de medida aplicados.

En el estudio Alergológica 2015 (3) se describe el aumento de la prevalencia de la alergia a alimentos en las 2 últimas décadas, desde un 3,6% en 1995 a 7,4% en 2005 y a un 11,4% en 2015. En cuanto al género y edad, se objetivó un descenso de la alergia a alimentos en la edad infantil e incremento en la adolescencia así como un predominio en mujeres (56,4%).

El aumento de la prevalencia de la alergia a alimentos podría explicarse por la interacción genético-ambiental (4): diversidad microbiana cambiante (hipótesis de la higiene), prácticas de alimentación del lactante (momento de introducción de lactancia artificial y de alimentos sólidos) así como el déficit de vitamina D (5).

En este estudio nos centraremos en alergia a alimentos de origen vegetal mediada por IgE.

1.2. Alergia a alimentos de origen vegetal

La alergia a alimentos se considera un problema sociosanitario importante, no sólo por su elevada prevalencia sino por empeorar significativamente la calidad de vida y en ocasiones por desencadenar reacciones graves y potencialmente mortales siendo en algunos casos amenazantes para la vida.

INTRODUCCIÓN

Los alimentos de origen vegetal o alimentos vegetales son aquellos que se obtienen a partir de diversas partes de las plantas como frutas, frutos secos, semillas, etc.

Según resultados del estudio Alergológica realizado en España en 1995 (6), 2005 (7) y confirmados 10 años después (3), se determinó que la causa más frecuente de alergia a alimentos vegetales correspondió a frutas (44,7%) y frutos secos (28,4%).

1.3. Sintomatología de la alergia a alimentos

La alergia a alimentos mediada por IgE puede producir síntomas leves afectando de forma aislada a la cavidad orofaríngea, denominado síndrome de alergia oral (SAO) o producir síntomas graves y que impliquen a varios órganos (anafilaxia). En ocasiones puede existir un cofactor asociado (ejercicio, analgésicos etc.). La sintomatología típica suele iniciarse rápidamente (por lo general, de minutos a 2 horas) pero también puede aparecer pasado este tiempo.

La mayoría de las reacciones sistémicas son mediadas por IgE y puede existir afectación de uno o más órganos: piel, vías respiratorias, tubo digestivo y sistema cardiovascular (Tabla 1). El órgano más frecuentemente implicado en las reacciones sistémicas por alergia a alimentos es la piel (urticaria y/o angioedema) afectando a más de un 80% de los casos (8).

ÓRGANO AFECTADO	SÍNTOMAS
Piel	<ul style="list-style-type: none">• Enrojecimiento/prurito• Urticaria/angioedema• Urticaria de contacto• Exantema morbiliforme
Aparato Respiratorio	<ul style="list-style-type: none">• Rinoconjuntivitis• Laringoespasmo• Sibilancias/broncoespasmo
Aparato Digestivo	<ul style="list-style-type: none">• Síndrome de alergia oral (SAO)• Anafilaxia digestiva
Afectación multiorgánica	<ul style="list-style-type: none">• Anafilaxia generalizada• Anafilaxia alimentaria inducida por ejercicio

Tabla 1. Manifestaciones de la alergia a alimentos mediada por IgE. Tomada de Metcalfe, edición 2016, capítulo 10, página 133.

INTRODUCCIÓN

En 1987 Amlot y col., (9) describieron por primera vez el SAO, caracterizado por síntomas localizados en la mucosa oral que incluyen prurito y sensación de hormigueo en labios, boca o garganta que pueden aparecer de forma aislada o asociados a otros síntomas de mayor gravedad. Suele presentarse en pacientes sensibilizados a pólenes por reactividad cruzada entre alérgenos implicados. Un ejemplo de ello es la asociación entre la alergia a avellana y a polen de abedul en el centro de Europa (10).

1.4. Diagnóstico de la alergia a alimentos

El diagnóstico se basa en establecer una relación causa-efecto mediante la historia clínica minuciosa y detallada o mediante pruebas de provocación, así como demostrar la implicación de un mecanismo inmunológico, por lo general mediado por IgE, mediante pruebas cutáneas o determinación de IgE específica (11).

En algunos casos, alcanzar el diagnóstico puede ser complejo por distintos motivos: 1) Mala calidad y ausencia de estandarización de algunos de los extractos de alimentos 2) Problemas metodológicos que como consecuencia de la labilidad de muchos de sus alérgenos pierdan la actividad alergénica durante la elaboración del material para la provocación 3) La frecuente polisensibilización y reactividad cruzada con una trascendencia clínica variable, y en consecuencia un gran número de resultados falsos positivos y negativos.

1.5. Alérgenos de origen vegetal

Los alérgenos alimentarios pertenecen a grupos de familias de proteínas clasificadas según su secuencia de aminoácidos, estructura tridimensional y función gracias a la existencia de herramientas de bioinformática. En la actualidad disponemos de algunas bases de datos que nos permiten conocer en profundidad los distintos alérgenos descritos hasta la fecha. Entre ellas se encuentran:

- WHO-International Union of Immunological Societies (IUIS): se encarga del depósito de secuencias de alérgenos con enlaces. Es el único organismo oficialmente capaz de dar denominaciones de alérgenos.
- Allergome: aporta información sobre moléculas y fuentes alergénicas responsables de reacciones alérgicas mediadas por IgE. Además, incluye datos

INTRODUCCIÓN

epidemiológicos y referencias bibliográficas sobre sus propiedades, origen, taxonomía y función biológica.

Las proteínas de plantas presentes en alimentos se clasifican en familias y en superfamilias según sus propiedades estructurales y funciones que se describen a continuación (12):

1.5.1 Proteínas protectoras o proteínas de defensa

Son proteínas sintetizadas por las plantas como mecanismo de defensa frente al ataque de patógenos (virus, bacterias, hongos), plagas (insectos, nematodos, ácaros) así como de condiciones meteorológicas adversas. Son las llamadas “pathogenesis-related response” o proteínas PR (13, 14).

Con excepción de las PR-10, presentan una estructura compacta estabilizada por puentes disulfuro que las convierte en resistentes a tratamientos térmicos y a la digestión por proteasas digestivas (15). La alta identidad de secuencia y similitud de estructura tridimensional entre ellas constituirá la base molecular de reactividad cruzada entre alimentos de origen vegetal así como entre stos y pólenes.

Las familias de las proteínas de defensa, así como sus alérgenos representativos son: (Tabla 2)

Familia	Alérgenos representativos (alimento o fuente alérgica)
Homólogos de Bet v 1 (PR-10)	Api g 1 (apio), Dau c1 (zanahoria), Mal d 1 (manzana), Gly m 4 (soja), Ara h 8 (cacahuete)
Proteínas transportadoras de lípidos (nsLTP: PR14)	Pru p 3 (melocotón), Mal d 3 (manzana), Cit s 3 (naranja), Zea m 14 (maíz), Cor a 8 (avellana)
Quitinasas y proteínas con dominio heveína (PR 3,4,8)	Pres a 1 (aguacate), Cas s 5 (castaña), Bra r 2 (nabo), Hev b 6.01 (látex)
Taumatinas (PR5)	Act c 2 (kiwi), Mal d 2 (manzana), Pru av 2 (cereza)
Inhibidores de alfa amilasa	Hor v 15 (cebada)
Proteasas: Cistein-proteasas Serín-proteasas	Act c 1 Cuc m 1
Peroxidasas (PR9)	Trigo, cebada y tomate
Proteínas PR1	Cuc m 3 (melón)

INTRODUCCIÓN

Inhibidores de proteasas: Inhibidores de tripsina Cistein-proteasas Otros	Kunitz (soja) Sola t 3 (patata) Sola t 4, Sola t 2
--	--

Tabla 2. Proteínas protectoras o proteínas de defensa. Adaptada del Tratado de Alergología, 2ª Edición, Tomo III , capítulo 12, página 978.

1.5.1.A Homólogos de Bet v 1 o PR-10

Son proteínas de defensa pertenecientes al grupo PR-10. Su estructura la conforman hojas beta con alfa hélices formando cilindros unidos por unos bucles dejando una cavidad común que atraviesa la proteína, cuya función pudiera ser la de transportar esteroides (16). La familia Bet v 1 está formada por alérgenos de aproximadamente 18 kDa con identidades de secuencia que varían entre un 40 y 90%. En 1983 se purificó un alérgeno de 17 kDa, Bet v 1, alérgeno mayoritario del polen de abedul. En las zonas ricas en abedules y otras especies del orden fagales (aliso, avellano, etc.), el 95% de los pacientes están sensibilizados a polen de abedul (70% monosensibilizados) y es muy frecuente presentar síntomas con alimentos de origen vegetal (rosáceas, frutos secos, apiáceas y leguminosas) por la presencia de alérgenos homólogos a Bet v 1 (17, 18). A diferencia de las nsLTP, los homólogos de Bet v 1 suelen predominar en la pulpa. Su labilidad y sensibilidad a tratamientos térmicos, así como a la digestión por proteasas digestivas (19) explica que la sintomatología principal se localice en la cavidad oral (20), aunque también se hayan descrito casos aislados de anafilaxia (21). Es característico por tanto que estos pacientes toleren el alimento procesado (zumos, mermeladas) (22).

1.5.1.B Proteínas transportadoras de lípidos (nsLTP; PR-14)

Pertenecen al grupo PR-14 de proteínas de defensa cuya función es la unión y transferencia de lípidos entre distintos sistemas de membranas. En 1992 Lleonart y col., (23) describieron por primera vez un alérgeno de 9 kDa en extracto de melocotón que posteriormente sería identificado por Sanchez Monge y col., (24) y por Pastorello y col., (25). Constituyen una familia de polipéptidos de 9 kDa con un amplio rango de similitud en su estructura primaria (30-95% de identidad de secuencia) (26). Poseen una estructura terciaria o tridimensional compartida y muy estable formada por cuatro cadenas alfa hélices unidos por cuatro puentes disulfuro (27). Son resistentes al calor y a la hidrólisis

INTRODUCCIÓN

por enzimas de tracto digestivo (28) por lo que mantienen su potencial alergénico en alimentos procesados, pudiendo producir síntomas sistémicos y poner en peligro la vida del paciente. Sin embargo, es frecuente que produzcan SAO (29). Se encuentran en mayor cantidad en las capas epidérmicas de los órganos vegetales, con una concentración hasta siete veces mayor en piel lo que justifica que algunos pacientes toleren el alimento pelado (30).

La nsLTP más importante en nuestra zona es la nsLTP de melocotón Pru p 3. A pesar de que este alérgeno es la causa más frecuente de alergia a alimentos en el área mediterránea (31), también se ha descrito en Europa central (32) aunque con menor prevalencia. La identidad de secuencia entre distintas nsLTPs es variable con amplia reactividad cruzada entre ellas pero con una trascendencia clínica alrededor del 30-50% (33).

Se han descrito en el melocotón y en otras frutas de la familia Rosaceae (Pru p 3, Mal d 3, Pru ar 3, Pru d 3, Pruv av 3, etc.) (25) (24), pero también se encuentran en otros alimentos como en frutos secos: Cas s 8 (castaña) (34), Cor a 8 (avellana) (35), Jug r 3 (nuez de nogal) (36), leguminosas: Ara h 9 (cacahuete) (37), len c 3 (lenteja) (38) Cic a 3 (garbazo) (39), Pha v 3 (judía verde) (40); frutas: Act d 10 (kiwi) (41), Vit v 1 (uva) (42), Mus a 3 (plátano) y cítricos (43); hortalizas: lac s 1 (lechuga) (44), Asp o 1 (espárrago) (45), Sol al 3 (tomate) (46); cereales: Zea , 14 (maíz) (47); látex: Hev b 12 (48) y pólenes: Ole e 7 (olivo), Parj 1,2 (parietaria), Art v 3 (artemisia vulgaris), Pla a 3 (plátano de sombra), Amb a 6 (ambrosía) (49, 50).

1.5.1.C Quitinasas y alérgenos con dominio heveína (PR-3,-4 y -8)

Las quitinasas son proteínas de defensa pertenecientes a los grupos 3 y 4 cuya función es la hidrólisis de las uniones β -1,4 acetil-D-Glucosamina en polímeros de quitina. Su tamaño molecular oscila entre 30 y 35 kDa y presentan dos dominios en su estructura: el dominio heveína N-terminal de 4,7 kDa que comparte elevada identidad de secuencia (60-70%) con la heveína del látex y el dominio catalítico de 26 kDa.

Constituyen el grupo de alérgenos asociados al síndrome látex-frutas (51). Esta asociación se debe fundamentalmente a la reactividad cruzada entre la heveína (Heb v 6-02), alérgeno mayor del látex y los dominios similares a heveína de las quitinasas de frutas y otros alimentos de origen vegetal. Las frutas más claramente asociadas a este síndrome son aguacate (Pers a 1), castaña (Cas s 5), plátano (Mus a 2) y kiwi (Act c

INTRODUCCIÓN

chitinase I, IV y Act d chitinase). También se han descrito casos de reacciones cruzadas entre el látex y otras frutas, como melocotón, piña, fruta de la pasión, uva, guayaba, chirimoya, papaya, mango, melón y frutos secos (almendra, piñón y cacahuete) (52). Con respecto a sus propiedades físicas y químicas, son proteínas termosensibles y resistentes al tratamiento enzimático por lo que se ha descrito que el 42% de los pacientes presentan síntomas sistémicos y un 58% sintomatología de carácter leve (53).

1.5.1.D Taumatinas (PR-5)

Las taumatinas (TLP: Thaumatin-like proteins) son proteínas de defensa, especialmente frente a hongos, de 20-30 kDa pertenecientes al grupo 5 de proteínas de defensa vegetal (PR-5).

Presentan una estructura tridimensional compacta y estable mantenida mediante la unión de ocho puentes disulfuro. Son generalmente resistentes a la degradación proteolítica (gástrica e intestinal), al pH (estables a pH bajo) o a la desnaturalización inducida por el calor en el procesamiento de los alimentos por lo que pueden producir síntomas sistémicos (54, 55).

Las taumatinas han sido descritas en frutas, frutos secos, cereales y pólenes siendo por tanto un panalérgeno. La primera taumatina alergénica descrita fue la de manzana (Mal d 2) (56). Posteriormente se han descrito en melocotón (Pru p 2) (57) cereza (Pru a 2) (58), pimienta (59), kiwi (60-62), uva (42), plátano (63), piel de melón (64), trigo (65) y en pólenes como el del ciprés y el platanero (54). En los últimos años se han descrito en avellana, castaña (54), níspero (66), lechuga (67) y cannabis (68).

1.5.2 Proteínas estructurales

1.5.2.A Profilinas

Las profilinas son proteínas de 12-15 kDa relacionadas con el citoesqueleto celular participando en la forma y movimiento de las células mediante la polimerización de filamentos de actina. Su estructura tridimensional consiste en 7 láminas beta antiparalelas en su parte central recubiertas por hélices alfa a ambos lados (69). Son sensibles al calor y a proteasas digestivas por lo que el alimento procesado es tolerado y el síntoma característico es el síndrome de alergia oral (SAO) (70) a pesar de que se han descrito síntomas sistémicos (71) en zonas con alta prevalencia de sensibilización a profilina.

INTRODUCCIÓN

Presentan una estructura altamente conservada (70% de identidad de secuencia) y alta reactividad cruzada por lo que se ha definido como marcador predictivo de reacciones alérgicas a múltiples fuentes de pólenes y de alergia a polen asociada a alimentos (72). La prevalencia de sensibilización a profilinas varía en función del área geográfica y el tipo de perfil alérgico (73).

Se han identificado numerosas profilinas pertenecientes a alimentos, látex y a pólenes, algunos ejemplos son: Cuc m 2 (melón), Citr l 2 (sandía), Sol a 1 (tomate), Cit s 1 (naranja), Cor a 2 (avellana), Jug r 7 (nuez), Fra a 4 (fresa), Mal d 4 (manzana), Pru av 4 (cereza), Pru du 4 (melocotón), Pyr c 4 (pera), Lit c 1 (lichi), sin a 4 (mostaza), Hev b 8 (látex), Phl p 12 (gramíneas) y Pho d 2 (palmera) entre otros.

1.5.2.B Oleosinas

Los oleosomas o cuerpos oleaginosos son orgánulos esféricos donde se almacenan lípidos (triglicéridos) que serán utilizados como fuente energética para la germinación de semillas. Se encuentran en semillas de plantas oleaginosas (soja, maíz, colza, girasol, frutos secos y sésamo) pero también en algas, musgos, helechos y algunas especies de la familia *Brassicaceae* (74, 75). Su estructura la compone un núcleo lipídico rodeado por una capa de fosfolípidos y de proteínas: oleosinas (15-24 kDa), caleosinas (~ 30 kDa) y esteroleosina (~ 40 kDa) (76). Éstas dos últimas, son alérgenos menores cuya relevancia clínica aún es desconocida.

Las oleosinas son las proteínas más abundantes porque representan el 80-90% del total de la proteína. Se consideran verdaderos alérgenos lipofílicos, su estructura primaria se compone de un dominio hidrofóbico central rodeado de dos dominios hidrofílicos (77) cuya función es estabilizar los oleosomas, prevenir su coalescencia y poseer actividad enzimática.

Hasta la fecha se han descrito oleosinas del cacahuete (Ara h 10, Ara h 11, Ara 14 y Ara h 15), (78-80), avellana (Cor a 12 y Cor a 13) (81), nuez (82), semilla de girasol (83), sésamo (Sesi 4 y Sesi 5) (84), soja (85) y lino (86). Algunas de ellas se han asociado a reacciones alérgicas graves (81, 84) y se sabe que el procesado de los alimentos puede alterar las propiedades de las oleosinas incrementando su capacidad alérgica (efecto Maillard).

INTRODUCCIÓN

La prevalencia de sensibilización a oleosinas es baja, esto puede deberse a que los extractos usados para el diagnóstico “in vitro” e “in vivo” no contienen oleosinas por ser insolubles en soluciones acuosas o salinas dificultando por tanto el diagnóstico. Por ello, otras herramientas han de tenerse en cuenta para el correcto diagnóstico (87) y establecer la importancia real de la alergia a oleosinas.

1.5.3 Proteínas de almacenamiento

Las proteínas de almacenamiento son proteínas de reserva, cuya función principal es el suministro de nutrientes durante la germinación. Suelen ser los alérgenos principales de los frutos secos, también lo son de semillas y de legumbres.

Se caracterizan por ser resistentes al calor y a las proteasas, no están relacionadas con alergia a pólenes y la sensibilización a estas proteínas suele ser un marcador de riesgo de reacciones graves (88).

Se clasifican en dos grandes superfamilias: Cupinas y Prolaminas. Las más importantes son las globulinas 7S y 11S de las cupinas y las albúminas 2S de las prolaminas.

1.5.3.A Superfamilia de las Cupinas

Es característico de los miembros de esta familia la presencia de dominios de “barril beta” o dominio “cupina” en su estructura tridimensional que parece estar relacionado con la estabilidad térmica que poseen (89).

La familia de las Cupinas incluye tres tipos de proteínas:

- Globulinas 11S o leguminas
- Globulinas 7S o vicilinas
- Germinas

1.5.3.A.1 Globulinas 11S, leguminas o alfa conglutinas

Son proteínas hexaméricas de 300-450 kDa ensambladas inicialmente como trímeros. Formadas por dos dominios que forman una estructura de 40 a 60 kDa. Cada subunidad se compone de dos cadenas: una cadena ligera, básica o beta, de 20 kDa, y la cadena pesada, ácida o alfa, de 30-40 kDa, ambas unidas por un puente disulfuro. Son proteínas de almacenamiento de vegetales, no glicosiladas, solubles en soluciones salinas con un

INTRODUCCIÓN

coeficiente de sedimentación 11S, resistentes a la temperatura y a la digestión gástrica (88).

Se han descrito leguminas alergénicas en frutos secos, semillas, legumbres, cereales y otros alimentos de origen vegetal (Tabla 3).

FRUTOS SECOS	SEMILLAS	LEGUMBRES	OTROS
Ara h 3: Cacahuete	Sin a 2: Mostaza	Gly m 6: Soja	Act d 12: Kiwi
Ara f 3: Cacahuete	Ses i 6: Sésamo	Gly s 6: Soja	Act c 12: Kiwi
Cor a 9: Avellana	Ses i 7: Sésamo	Cic a 6: Garbanzo	Tri fg 3: Trigo
Ana o 2: Anacardo	Ric c 2: Ricino	Lup an: alpha Conglutin	Sola 1 11S Globulin: Tomate
Jug r 4: Nuez de nogal		Lup a: alpha Conglutin	
Pha ca 11S: Pistacho			
Pis v 2: Pistacho			
Pis v 5: Pistacho			
Car i 4: Nuez pecana			
Jug n 4: Nuez negra			
Coc n 4: Coco			
Pru du 6: Almendra			
Ber e 2: Nuez de Brasil			

Tabla 3. Globulinas 11S alergénicas. En color azul los aceptados por IUIS, en negro Allergome.

Existe disponibilidad comercial de leguminas en CAP y/o ISAC: Ara h 3 (cacahuete), Gly m 6 (soja) y Cor a 9 (avellana) en CAP y Ara h 3 (cacahuete), Gly m 6 (soja), Cor a 9 (avellana), Ana o 2 (anacardo) en ISAC.

Poseen una identidad de secuencia de baja (38%) pero con epítomos bien conservados y una similitud de hasta 55% aproximadamente que pudiera justificar la existencia de RC. Suele ser un marcador de fenotipo grave.

1.5.3.A.2 Globulinas 7S, vicilinas, convicilinas o beta conglutinas

Son proteínas triméricas de 150-180 kDa con dos monómeros de 40-80 kDa de una única cadena polipeptídica. Son proteínas glicosiladas, no contienen cisteína ni tampoco

INTRODUCCIÓN

puentes disulfuro por lo que el resultado del SDS-PAGE no se modifica con la utilización de agentes reductores. Con respecto a sus propiedades físicas y químicas, y al igual que las globulinas 11S, son resistentes a la digestión proteolítica y poseen gran estabilidad térmica de forma que en ocasiones el calentamiento puede producir un incremento de la potencia alergénica como consecuencia de la pérdida de la estructura beta del dominio “cupina” (90).

Se han descrito leguminas alergénicas en frutos secos, semillas, legumbres, cereales y otros alimentos de origen vegetal (Tabla 4). Las mejor caracterizadas son las vicilinas del cacahuete (Ara h 1), soja (Gly m 5) y lenteja (Len c 1). Ara h 1 fue el primer alérgeno descrito del cacahuete, presente en el 12-16% del contenido del cacahuete, produce sensibilización en un 95% de los pacientes y es responsable de reacciones sistémicas.

LEGUMBRES	FRUTOS SECOS	OTROS
Ara h 1: Cacahuete	Con n 1: Coco	Ses i 3: Sésamo
Fag e 3: Alforfón	Coc n 2: Coco	Zea m G1: Maíz
Gly m 5: Soja	Jug n 2: Nuez	Sola l Vicilin: Tomate
Len c 1: Lenteja	Jug r 2: Nuez	Tri fg 1: Fenogreco
Lup an 1: Altramuz	Jug r 6: Nuez	
Pis s 1: Guisante	Cor a 11: Avellana	
Pis s 2: Guisante	Pin v vicilin: Piñón	
Caj ca 1: Lenteja	Ana o 1: Anacardo	
Cic a 1: Garbanzo	Pis v 3: Pistacho	
Lot ja 1: Lotus japonicus		
Phav phaseolin: French bean		
Vig r beta-conglycinin: Mung bean		

Tabla 4. Globulinas 7S alergénicas. En color azul los aceptados por IUIS, en negro Allergome.

La homología entre vicilinas de leguminosas es elevada con frecuente RC entre ellas y baja entre soja y cacahuete. La identidad de secuencia es baja (35-45%) con otras leguminas.

INTRODUCCIÓN

Existe disponibilidad comercial de globulinas 7S en CAP y/o ISAC: Ara h 1 (cacahuete) y Gly m 5 (soja) en CAP y Ara h 1 (cacahuete) Jug r 2 (nuez) y Gly m 5 (soja) en ISAC.

1.5.3.A.3 Germinas

También conocidas como GLP “Germin-like proteins” son homohexámeros de aproximadamente 250 kDa cuyos monómeros de 25 kDa se ensamblan formando dímeros o trímeros. Se caracterizan por su solubilidad, carácter glicoproteico, resistentes a enzimas proteolíticas y gran estabilidad térmica (91, 92).

La actividad alergénica de las germinas se conoce parcialmente y continúa en estudio por lo que es difícil establecer su importancia real. Tri a germin del trigo fue la primera germina descrita (93), posteriormente se han caracterizado otras germinas de frutas: Cit cl 1 (clementina) (94) Cit l 1 (limón), Cit s 1 (naranja) (43, 94) y especias como Pip n 28kD (pimienta negra) (95).

1.5.3.B Superfamilia de las Prolaminas

Los miembros de esta familia presentan una estructura tridimensional rica en hélices alfa. La constituyen dos grupos de proteínas, las prolaminas propiamente dichas y las albúminas 2S cuyas secuencias de aminoácidos están muy poco relacionadas.

1.5.3.B.1 Prolaminas y gluteninas

Son proteínas cuyos aminoácidos son ricos en prolina y en glutamina, insolubles en agua y en soluciones salinas. Se han descrito fundamentalmente en el trigo (96) aunque también en el arroz y en la cebada, afectando fundamentalmente a manipuladores de cereales descritas en el asma del panadero donde se han implicado proteínas con capacidad inhibitoria (97) así como gliadinas (98).

1.5.3.B.2 Albúminas 2S o delta conglutinas

Las albúminas 2S son proteínas heterodímeras de 15 kDa aproximadamente formadas por cinco alfa hélices unidas por cuatro puentes de disulfuro formando una estructura compacta, lo que les confiere resistencia a las enzimas proteolíticas y a la

INTRODUCCIÓN

desnaturalización por calor siendo por tanto capaces de producir cuadros de alergia graves. Son solubles en agua y ricas en aminoácidos (glutamina, arginina y cisteína) lo que facilita el proceso de germinación.

Las albúminas 2S son los alérgenos mayoritarios de legumbres, frutos secos y especias, pueden producir síntomas por ingestión y por inhalación (99, 100). Se han descrito 29 albúminas 2S alergénicas en frutos secos, semillas, legumbres, cereales y otros alimentos de origen vegetal. (Tabla 5).

FRUTOS SECOS	SEMILLAS	LEGUMBRES
Ana o 3: Anacardo	Bra j 1: Mostaza china	Ara d 2 y 6: A.duranensis
Ber e 1: Nuez de brasil	Bra n 1: colza	Ara h 2, 6 y 7: Cacahuete
Car i 1: Nuez pecana	Bra r 1: Nabina	Ara i 2 y 6: A.ipaensis
Cor a 14: Avellana	Ric c 1 y 3: Ricino	Cic a 2S A/b: Garbanzo
Hel a 2S A/b: Pipa de girasol	Ses i 1 y 2: Sésamo	Tri fg 2: Frenogreco
Jug ca/ci/ n 1: Nuez	Sin a 1: Mostaza	Fag e 2: Alforfón
Jug r 1: Nuez	Act d 13: Kiwi	Fag t 2: Alforfón
Pis v 1: Pistacho		Gly m 8: Soja
Pru du 2S Album: Almendra		Lup a/an delta conglut: Altramuz

Tabla 5. Albúminas 2S alergénicas. En color azul los aceptados por IUIS, en negro Allergome.

La frecuencia de sensibilización a albúminas 2S y en concreto a Ara h 2 disminuye con la edad (101).

Existe disponibilidad comercial de albúminas en CAP y/o ISAC: Ara h 2, 6 (cacahuete), Ber e 1 (nuez de Brasil), Jug r 1 (nuez), Cor a 14 (avellana) en CAP y Ses i 1 (sésamo), Ara h 2, 6 (cacahuete), Jug r 1 (nuez) y Fag e 2 (alforfón) en ISAC.

Las proteínas de este grupo presentan identidad de secuencias y de similitud baja siendo mayor entre albúminas de la misma familia.

1.6 Reactividad cruzada de la alergia a alimentos

La Reactividad cruzada (RC) es aquel fenómeno inmunológico por el cual un mismo anticuerpo IgE reconoce distintos antígenos con una elevada homología estructural o

INTRODUCCIÓN

identidad de secuencia (102, 103). La región del antígeno que se une al anticuerpo se denomina epítipo, formado por 5-6 aminoácidos. La similitud de secuencias, denominada homología, será responsable de la RC entre familias de alérgenos relacionadas o no taxonómicamente. Este mecanismo es el responsable de que un individuo alérgico a un alimento pueda desarrollar reacciones alérgicas a otros alimentos que compartan proteínas homólogas.

Las guías de la Organización mundial de la salud establecen la posibilidad de de RC entre alérgenos (104) si comparten al menos un 35% de identidad de secuencia del total de un fragmento de 80 aminoácidos o identidad completa con un péptido de 6-8 aminoácidos consecutivos. La complejidad de este fenómeno radica en la trascendencia clínica, debido a que estos pacientes tienen pruebas cutáneas positivas a varios grupos de alimentos, sin que en ocasiones, tenga relevancia clínica alguna. Por ello es fundamental una anamnesis exhaustiva además de pruebas de provocación oral en aquellos casos en los que se considere necesario.

La RC se demuestra mediante ensayos de inhibición de la captación de IgE sérica y a través de técnicas de biología molecular y proteómica se identificaría el alérgeno responsable de la misma.

La reactividad cruzada puede existir entre especies filogenéticamente cercanas (alimentos de la misma familia) o entre familias taxonómicamente no relacionadas por la existencia de proteínas homólogas (105).

Los frutos secos son un grupo de alimentos no relacionados taxonómicamente cuya reactividad cruzada entre ellos es frecuente en la mayoría de los casos por proteínas de almacenamiento, nsLTPs, profilinas, homólogos de Bet v 1 y oleosinas. En zonas del Mediterráneo es frecuente la asociación clínica entre la alergia a frutas Rosáceas y a frutos secos (106-108) siendo la nsLTP el panalérgeno responsable.

1.7 Alergia a pólenes-alimentos vegetales

La alergia a alimentos vegetales y la alergia al polen están íntimamente relacionadas y se considera la forma más frecuente de alergia a alimentos entre los adolescentes y adultos europeos (109-111). El patrón de sensibilización de IgE de cada individuo y por tanto, su

INTRODUCCIÓN

sintomatología vendrán determinados por la región geográfica y sus hábitos dietéticos (24, 112).

En el norte y centro de Europa, la prevalencia de asociación entre alergia a polen de abedul y alimentos es elevada por la alta identidad de secuencia entre el alérgeno principal del polen de abedul (Bet v 1) con alérgenos homólogos presentes en los alimentos vegetales como Mal d 1 en manzana, Pru av 1 en cereza, Api g 1 en apio, Dau c 1 en zanahoria, Cor a 1 en avellana, (113) entre otros. La clínica más frecuente presentada se localiza la cavidad oral (SAO) (20) aunque también se han descrito episodios de anafilaxia en pacientes con alergia a soja (21, 114), caqui, jaca (jack fruit) (115, 116), apio y zanahoria (117, 118).

Las gramíneas son los pólenes más frecuentes de alergia respiratoria a nivel mundial. Su asociación con alergia a alimentos se ha relacionado con sensibilización a profilinas (119) por lo que la sintomatología más frecuente se localizará en la cavidad oral. El estudio se complica con frecuencia por la implicación de determinantes de carbohidratos (CCDs) (120) que suelen ser responsables de falsas positividades en los test “in vitro”.

En una parte del norte de España, el 36% de los pacientes estaba sensibilizado a polen de artemisia (72% presentaban IgE específica a Art v 3), 33% a pólenes de gramíneas y el 24% a plátano de sombra (94% presentaban IgE específica a Pla a 3) siendo el melocotón el alérgeno alimentario más frecuentemente implicado (69%) seguido de nuez (55%), cacahuete (54%) y avellana (121).

Con respecto a pólenes de malezas, Art v 1 es el alérgeno mayoritario de la *artemisia vulgaris*, responsable de la sensibilización en el 95% de los pacientes. Su asociación con alergia a alimentos (síndrome apio-abadul-artemisa-especias) (122) es menos frecuente pero responsable de síntomas más graves (117).

1.7.1 Alergia a pólenes-melocotón en Europa

La alergia a melocotón es la alergia alimentaria más frecuente en la edad adulta (112, 123). En España y en otras zonas mediterráneas, Pru p 3 es el alérgeno mayoritario del melocotón (124). Se han descrito dos patrones de sensibilización en Europa, en el centro y por su asociación con Bet v 1 y profilinas (Bet v 2) será frecuente la localización de la sintomatología en la cavidad oral mientras que en el sur la sintomatología presentada será

INTRODUCCIÓN

con mayor frecuencia sistémica por su asociación con Pru p 3 (nsLTP) (24). Sin embargo, cabe destacar que en Europa central existe la sensibilización a nsLTP (32) y en el sur de Europa, concretamente en el norte de España, existe un patrón mixto nsLTP-profilina-Bet v 1 (125).

1.7.2 Alergia a pólenes-frutos secos en Europa

En Europa, en los países donde es predominante la alergia a abedul, el fruto seco causante del mayor número de reacciones es la avellana mientras que en España donde predomina la alergia a melocotón, lo son la nuez y la avellana (73). Existen diferencias en los perfiles moleculares de sensibilización dentro de Europa, siendo Cor a 1 (PR-10) el alérgeno más frecuente en el centro y norte de Europa mientras que Cor a 8 (nsLTP) lo es en el sur (España) (126).

1.8 Tratamiento de la alergia a alimentos

El tratamiento de elección es la evitación estricta del alérgeno responsable de la reacción. Es de vital importancia la lectura del etiquetado con el fin de minimizar la posibilidad de pasar por alto un alérgeno con el que pudiese presentar una reacción alérgica. Instruir al paciente y a los padres en el manejo del tratamiento agudo médico (antihistamínicos, corticoides, inhaladores y adrenalina autoinyectable) ayudará a evitar el desenlace fatal de algunas de las reacciones. Otros tratamientos descritos para tratar la alergia alimentaria a largo plazo son la inmunoterapia oral, sublingual y epicutánea (127).

1.9 Alergia a frutos secos

Los frutos secos se definen botánicamente como aquellos frutos que se componen de una cáscara dura y seca que protege la semilla pertenecientes a familias botánicas diferentes (128). Dentro de este grupo de alimentos se incluyen: almendra, avellana, nuez, semillas de girasol, pistacho, anacardo, castaña, piñón y cacahuete, este último a pesar de ser una leguminosa. Son una causa frecuente de alergia alimentaria tanto en niños como en adultos. No suele desaparecer con la edad (129) y se considera un problema de salud de importante magnitud por diferentes causas: son responsables de reacciones alérgicas graves (anafilaxia) (130), producen reacciones como alérgeno oculto y por la existencia de reactividad cruzada entre ellos y con otros alimentos de origen vegetal con trascendencia clínica variable.

INTRODUCCIÓN

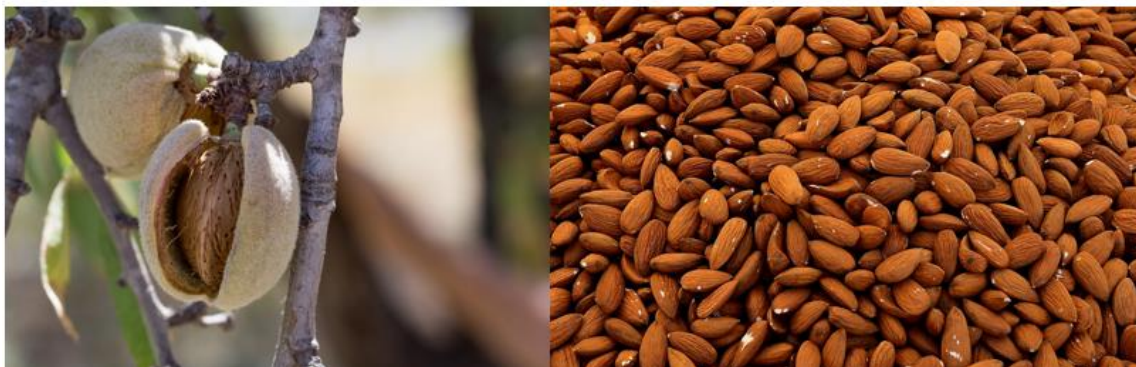
Su prevalencia es elevada pero no está bien establecida por diferentes causas: la carencia de estudios poblacionales prospectivos bien diseñados, así como la variabilidad que existe de unas zonas geográficas a otras (hábitos dietéticos, localización geográfica y exposición ambiental a pólenes).

En Europa, la avellana es el fruto seco responsable del mayor número de reacciones alérgicas, en Estados Unidos la nuez y el anacardo, en Inglaterra la nuez de Brasil, la almendra y la nuez mientras que el cacahuete es el responsable de reacciones graves en EEUU (131). Los alérgenos responsables de alergia a cacahuete en EEUU son por orden de frecuencia Ara h 2, Ara h 1 y Ara h 3.

Se estima que el 20-30% de pacientes con alergia a cacahuete asociará con frecuencia una alergia a frutos secos (132).

A continuación se describen los frutos secos más relevantes de nuestro medio así como sus principales alérgenos y su reactividad cruzada.

1.9.1 Almendra



La almendra, conocida taxonómicamente como *Prunus dulcis* or *Amygdalus communis* L., pertenece la familia Rosaceae, una subfamilia de la familia Prunoideae. Es el fruto de almendro (*Prunus dulcis*), mide 4 cm aproximadamente y es originaria del norte de África y del Medio Oriente. Crece de forma silvestre en Sicilia y Grecia y se cultiva extensamente en el norte de África, el sur de Europa, Australia y las partes más cálidas de los Estados Unidos (California).

Existen múltiples variedades de almendra siendo las más conocidas la almendra amarga (*Prunus dulcis* var. *amara*) y la almendra dulce (*Prunus amygdalus* var. *Dulcis*).

INTRODUCCIÓN

1.9.1.A Alérgenos

Hasta la fecha se han identificado 8 grupos de alérgenos en la almendra (Tabla 6) aunque sólo Pru du 3, 4, 5 y 6 se han incluido en IUIS.

NOMBRE DEL ALÉRGENO	IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA
Pru du 1	Bet v 1 like
Pru du 2	Taumatina
Pru du 2S	Albúmina 2S
Pru du 3	nsLTP
Pru du 4	Profilina
Pru du 5	Proteína ribosómica ácida
Pru du 6	Globulina 11S Amandin
Pru du AP	Proteasa aspártica

Tabla 6. Alérgenos de almendra (*Prunus dulcis*). En color azul los aceptados por IUIS, en negro Allergome.

El componente mayoritario de la almendra es la amandin, una proteína de almacenamiento presente en el 65% de la proteína en solución acuosa (133). Es una legumina 11S termorresistente (134), su conformación es hexamérica, formada por dos polipéptidos de 42-46 y 20-22 kDa unidos mediante puentes disulfuro.

1.9.1.B Reactividad cruzada

Se ha descrito reactividad cruzada entre la albúmina 2S del cacahuete con almendra y nuez de Brasil (135) y entre almendra y piñón (136).

La reactividad cruzada entre la nsLTP de la almendra con otras rosáceas es variable (108).

La nsLTP del albaricoque tiene una identidad de secuencia de 91% con la nsLTP del melocotón y del 94% con la nsLTP de la almendra (137).

Además, la profilina de almendra (Pru du 4) presenta reactividad cruzada con la profilina de pólenes de gramíneas y es susceptible de desnaturalización (138).

INTRODUCCIÓN

1.9.2 Avellana



La avellana (*Corylus avellana*) pertenece a la familia Betulaceae o Corylaceae. El avellano es un árbol que crece en zonas templadas de Europa. Su fruto mide unos 2 cm aproximadamente y se encuentra rodeado de una cáscara dura.

Se pueden consumir frescas, tostadas o en alimentos de repostería, chocolates, así como en cremas de untar.

1.9.2.A Alérgenos

Se han aislado y caracterizado varios alérgenos en la avellana (Tabla 7). La sensibilización a Cor a 1 y Cor a 2 está relacionada con alergia a pólenes y a alimentos (139).

Cor a 9 (globulina 11S), Cor a 14 (albúmina 2S) son alérgenos específicos de alergia a avellana (139). Cor a 8 (nsLTP) y Cor a 9 se ha relacionado con el desarrollo de síntomas sistémicos (140).

NOMBRE DEL ALÉRGENO	IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA
Cor a 1	Bet v1-like
Cor a 2	Profilina
Cor a 6	Isoflavona reductasa (IFR)
Cor a 8	nsLTP
Cor a 9	Globulina 11S
Cor a 10	Heat shock protein 70
Cor a 11	Vicilina 7s
Cor a 12	Oleosina
Cor a 13	Oleosina
Cor a 14	Albúmina 2S
Cor he 1	Bet v1-like
Cor a TLP	Taumatina

Tabla 7. Alérgenos avellana. En color azul los aceptados por IUIS, en negro Allergome

INTRODUCCIÓN

1.9.2.B Reactividad cruzada

La alergia a avellana presenta unos patrones clínicos y de sensibilización distintos según la edad y área geográfica. En España, las reacciones sistémicas son más frecuentes dado el predominio de sensibilización a Cor a 8 (nsLTP) mientras que en Suiza y Dinamarca las reacciones alérgicas son leves (síndrome de alergia oral) por predominar a nivel molecular un patrón de sensibilización a Cor a 1, una proteína homóloga de Bet v 1 (141). Cor a 2, otra profilina relacionada con Bet v 2, se ha detectado en pacientes sensibilizados a pólenes de gramíneas y abedul (35). Cor a 11 (vicilina 7S) está poco estudiada (142).

1.9.3 Piñón



El piñón es la semilla de las especies del género *Pinus*, perteneciente a la familia de las coníferas, el grupo más grande de las gimnospermas (“semilla desnuda”). El piñón mide 1,5 cm aproximadamente y está recubierto de una cáscara dura. Su elevado contenido en fibra, ácidos grasos poliinsaturados y tocoferol le confiere la propiedad de antioxidante y cardioprotector siendo por tanto su ingesta beneficiosa para la salud. Europa, América y Asia son los principales consumidores de este fruto.

El piñón es un potente alérgeno cuya ingesta produce síntomas graves con más frecuencia (143) aunque se han descrito algunos casos de síntomas localizados en la cavidad oral (144).

1.9.3.A Alérgenos

Hasta la fecha, pocos son los alérgenos descritos del piñón (Tabla 8). Se han identificado y purificado dos alérgenos mayores de 6 y 50 kDa correspondientes a una albúmina y una vicilina 7S (144) y se han descrito la presencia de varias proteínas que unen IgE específica de 17 (145, 146), 30 y 44 kDa (136, 147, 148).

INTRODUCCIÓN

NOMBRE DEL ALÉRGENO	IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA
Pip p 1 Pip p 17 kDa Pip p vicilin	Albúmina ----- Vicilina 7S

Tabla 8. Alérgenos de piñón. En color azul los aceptados por IUIS, en negro Allergome.

1.9.3.B Reactividad cruzada

La alergia a piñón posee una baja reactividad cruzada con otros frutos secos y la mayoría de pacientes están monosensibilizados (148). La baja identidad de secuencia entre el piñón y otros frutos secos podría explicarse porque el piñón es la semilla del pino (gimnosperma), a diferencia de otros frutos secos que pertenecen a las angiospermas o plantas con flor.

1.9.4 Pistacho



El pistacho pertenece a la familia *Anacardiaceae*, junto con el anacardo y el mango. Su fruto mide 2 cm aproximadamente y está recubierto de una cáscara dura. Es originario del centro y suroeste asiático, aunque también se cultiva en California, Australia y más recientemente en España.

En un estudio realizado en EEUU, se ha determinado que la alergia a pistacho es responsable del 7% de las reacciones alérgicas por frutos secos (149). Se considera más frecuente en niños y los síntomas más característicos son SAO, clínica cutánea y anafilaxia (150-152).

INTRODUCCIÓN

1.9.4.A Alérgenos

Se han identificado y caracterizado cinco alérgenos del pistacho (Tabla 9), todos ellos son proteínas de almacenamiento a excepción de Pis v 4, Pis v 1 de 7 kDa perteneciente a la familia de las albúminas 2S, Pis v 2 y Pis v 5 de 32 kDa pertenecientes a la familia de las globulinas 11S, Pis v 3 de 45 kDa perteneciente al grupo de las vicilinas 11S y Pis v 4, una superóxido dismutasa de 23 kDa (153-156).

NOMBRE DEL ALÉRGENO	IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA
Pis v 1	Albumina 2S
Pis v 2	Globulina 11S
Pis v 3	Vicilina 11S
Pis v 4	Superóxido dismutasa
Pis v 5	Globulina

Tabla 9. Alérgenos del pistacho. En color azul los aceptados por IUIS, en negro Allergome.

1.9.5 Anacardo



El *anacardium occidentale* también conocido como anacardo, cajú o nuez de la india es originario de Sudamérica. En los últimos años se está exportando de otros países como Asia y África por lo que su consumo en platos de estos países es muy frecuente. Su fruto consta de dos partes, el seudofruto o manzana de cajú ampliamente utilizado para la elaboración de mermeladas y dulces y la nuez adyacente al seudofruto cuya forma es arriñonada, mide de 3 a 5 cm aproximadamente donde se aloja la semilla.

La alergia a anacardo produce una sintomatología variable, desde dermatitis de contacto (157), dermatitis atópica (158) así como con reacciones sistémicas (159).

INTRODUCCIÓN

1.9.5.A Alérgenos

Se han identificado y caracterizado tres alérgenos del anacardo (Tabla 10): Ana o 1 (vicilina 7S), Ana o 2 (globulina 11S), Ana o 3 (albúmina 2S) (160-162).

La sensibilización a Ana o 3 se ha descrito como un gran predictor de diagnóstico de alergia a anacardo y a pistacho (163).

NOMBRE DEL ALÉRGENO	IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA
Ana o 1	Vicilina 7S
Ana o 2	Globulina 11S
Ana o 3	Albumina 2S

Tabla 10. Alérgenos del anacardo. En color azul los aceptados por IUIS, en negro Allergome.

1.9.5.B Reactividad cruzada pistacho y anacardo

Se estima que más del 80% de los pacientes con alergia a pistacho asociarán alergia a otros frutos secos, siendo el de mayor frecuencia el anacardo (153) dado que la identidad de secuencias de Pis v 1 y Pis v2 con Ana o 3 y Ana o 2 es del 64 y 48% respectivamente. Sin embargo, muchos pacientes con alergia a pistacho y a anacardo estarán sensibilizados a otros grupos de frutos secos (164).

Se ha descrito reactividad cruzada con otros alimentos de origen vegetal pertenecientes a la familia *Anacardiaceae* como el mango (152) así como con el polen de parietaria y artemisia (150, 165).

1.9.6 Castaña



El castaño (*Castanea sativa*) pertenece a la familia de las Fagaceas cuyo fruto, la castaña, se encuentra en el interior de una cápsula espinosa. Es originaria del hemisferio norte y a pesar de existir distintas especies, la variedad europea, española o también conocida como la castaña dulce (*C.sativa*) es la más consumida.

1.9.6.A Alérgenos

Hasta la fecha, se han identificado y caracterizado diferentes alérgenos en la castaña (Tabla 11): Cas s 1 (homólogo de Bet v 1), Cas s 2 (profilina), Cas s 8 (nsLTP), Cas s 5 (quitinasa clase I), Cas s 9 (proteína de choque térmico) y Cas TLP (taumatina) así como una proteína de 24 kDa con homología a una legumina (166) cuya capacidad alergénica disminuye con la acción enzimática del tracto gastrointestinal.

NOMBRE DEL ALÉRGENO	IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA
Cas s 1	Bet v 1-like
Cas s 2	Profilina
Cas s 5	Quitinasa
Cas s 8	nsLTP
Cas s 9	Heat shock protein 20
Cas s TLP	Taumatina

Tabla 11. Alérgenos de la castaña. En color azul los aceptados por IUIS, en negro Allergome.

INTRODUCCIÓN

1.9.6.B Reactividad cruzada

A pesar de que la alergia a castaña se ha asociado con el síndrome látex-frutas por reactividad cruzada entre quitinasas de clase I: Cas s 5 (castaña), aguacate (Pers s 1), plátano (Mus a 1) y látex (Hev b 6.02) entre otras (167), la identificación de Cas s 2 (Profilina) y de la nsLTP (Cas s 8) ha permitido describir otro patrón de reactividad cruzada con otros pólenes y alimentos de origen vegetal (168, 169).

1.9.7 Semilla de girasol



Las semillas o pipas de girasol son el fruto del girasol (*Helianthus annuus*), planta originaria de América. La cáscara o pericarpio esconde la parte comestible. Se consumen tostadas, en forma de aceite o de margarinas.

1.9.7.A Alérgenos

Se han identificado diferentes alérgenos en la semilla o pipa de girasol (Tabla 12). La albúmina 2S (Hel a 2S) rica en metionina cuyo peso molecular en su forma madura es de 12 kDa y de 16-17 kDa en su forma inmadura, se ha sugerido como posible alérgeno mayor de la semilla de girasol responsable de reacciones de anafilaxia (170).

Otros alérgenos como Hel a 3 (nsLTP) y Hel a 4 (Art v 1-like) se han implicado en reacciones sistémicas (171).

NOMBRE DEL ALÉRGENO	IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA
Hel a 2S Hel a 3 Hel a 4	Albúmina 2S nsLTP Art v 1-like

Tabla 12. Alérgenos de la semilla de girasol. En color azul los aceptados por IUIS, en negro Allergome.

INTRODUCCIÓN

1.9.7.B Reactividad cruzada

En Europa la alergia a semilla de girasol se ha relacionado de forma estrecha con la alergia a pólenes de la familia *Compositae*, especialmente con la *Artemisia* cuyos síntomas varían desde leves (SAO) hasta sistémicos en pacientes monosensibilizados a dicho polen (165).

Se ha descrito una posible reactividad cruzada entre la albúmina 2S de la semilla de girasol con mostaza (172) y otros frutos secos (nuez de Brasil y pistacho) (173, 174).

1.9.8 Nuez



La nuez, fruto del nogal, pertenece a la familia *juglandaceae*. A pesar de que existen muchas especies, es la *Juglans regia* la más cultivada en Europa. Una cáscara dura de color pardo rojizo protege al fruto el cual es de aspecto redondeado y de unos 4-5 cm aproximadamente de diámetro. Su aporte nutricional así como sus propiedades beneficiosas para la salud hacen que sea un fruto seco de elevado consumo (175).

En EEUU, la nuez es el fruto seco responsable del mayor número de reacciones alérgicas (131).

1.9.8.A Alérgenos

Se han caracterizado 7 alérgenos de la nuez (Tabla 13). Jug r 1, Jug r 2 y Jug r 4 se han descrito como alérgenos principales en pacientes con sensibilización primaria a nuez con una prevalencia de unión de IgE del 65%, 60% y 57% respectivamente (176-178).

INTRODUCCIÓN

NOMBRE DEL ALÉRGENO	IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA
Jug r 1	Albumina 2S
Jug r 2	Vicilina 11S
Jug r 3	nsLTP
Jug r 4	Globulina 11S
Jug r 5	Bet v 1-like
Jug r 6	Vicilina 7S
Jug r 7	Profilina

Tabla 13. Alérgenos de la nuez *Juglans regia*. En color azul los aceptados por IUIS, en negro Allergome.

Sato y col., plantearon en un estudio la medición de Jug r 1 como herramienta útil para el diagnóstico de alergia a nuez (179). Jug r 3 también se ha descrito como alérgeno principal en el área mediterránea asociado al síndrome LTP (176).

1.9.8.B Reactividad cruzada

La asociación entre la alergia a nuez y otros frutos secos es en su mayoría consecuencia de la reactividad cruzada entre las albúminas 2S: nuez de Brasil con una identidad de secuencia del 46,1% entre Jug r 1 y Ber e 1 (177), anacardo (162), almendra y avellana (180), globulinas 7S: anacardo con una similitud entre Jug r 2 y Ana o 1 del 52-62% (181), leguminas: avellana, anacardo y cacahuete (176). Se ha descrito la reactividad cruzada entre nsLTPs de frutas rosáceas con determinados frutos secos entre los que además de la nuez, también se encuentra el cacahuete, la avellana y el pistacho (182).

1.9.9 Cacahuete



Arachis hypogaea, cacahuete o maní, es el fruto de la leguminosa de la familia de las fabáceas. A pesar de ello, se consideran frutos secos. El fruto se encuentra en el interior de una lámina fina rojiza recubierta a su vez de una cáscara dura y rugosa. Contiene un

INTRODUCCIÓN

44-56% de porción oleosa y un 22-30% de porción proteica (183). Su consumo deshidratado y tostado es elevado EEUU, España y Suecia mientras que en China es frecuente su consumo hervido y frito lo que configura diferente grado de alergenicidad siendo en los primeros de mayor potencial alergénico (184).

1.9.9.A Alérgenos

Ara h 1 (63,5 kDa), Ara h 2 (17,5 kDa) y Ara h 3 (60 kDa), todas ellas proteínas de almacenamiento, son los alérgenos mayoritarios del cacahuete (185). Ara h 1 y Ara h 2 representan un 12-16% y un 9% de proteína del extracto de cacahuete respectivamente (185) y ambos son responsables de una sensibilización en más de un 90% de pacientes con alergia a cacahuete (186). Ara h 4 es una isoforma de Ara h 3 (187).

Ara h 8 (PR-10) se considera un alérgeno principal en pacientes que asocian alergia a abedul y cacahuete (188). Ara h 9 (nsLTP) es un alérgeno relevante en el área mediterránea (189).

En España, la prevalencia de sensibilización a distintos alérgenos de cacahuete es variable: Ara h 2 es más frecuente en niños y Ara h 9 en adultos (101). Otros alérgenos han sido caracterizados. (Tabla 14).

NOMBRE DEL ALÉRGENO	IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA
Ara h 1	Vicilina 7S
Ara h 2	Albúmina 2S
Ara h 3	Globulina 11S
Ara h 5	Profilina
Ara h 6	Albúmina 2S
Ara h 7	Albúmina 2S
Ara h 8	Bet v1-like
Ara h 9	nsLTP-1
Ara h 10	Oleosina
Ara h 11	Oleosina
Ara h 12	Defensina
Ara h 13	Defensina
Ara h 14	Oleosina
Ara h 15	Oleosina
Ara h 16	nsLTP-1
Ara h 17	nsLTP-1
Ara f 3	Globulina 11S
Ara d 2	Albúmina 2S
Ara d 6	Albúmina 2S
Ara i 2	Albúmina 2S

INTRODUCCIÓN

Ara i 6 Ara h agglutinin	Albúmina 2S Aglutinina, lectina
-----------------------------	------------------------------------

Tabla 14. Alérgenos del cacahuete *Arachis hypogaea*. En color azul los aceptados por IUIS, en negro Allergome.

1.9.9.B Reactividad cruzada

Según Sicherer y col., en el 75% de los casos en EEUU la alergia a cacahuete debuta con la primera exposición a través del tracto gastrointestinal (149), sugiriendo por tanto que exista un contacto previo a través del embarazo, lactancia, exposición cutánea (aceite) o por reactividad cruzada con otras legumbres o frutos secos (190, 191). A pesar de la existencia de homología entre las proteínas del cacahuete con las de legumbres, la reactividad clínica es baja (192).

La alergia a cacahuete concomitante con otros frutos secos varía entre el 20 y el 68% (193, 194). Sin embargo, son numerosos los estudios que han demostrado la existencia de co-sensibilización entre ellos con ausencia de reactividad clínica demostrado mediante provocación oral controlada (195, 196).

Se ha descrito RC entre Ara h 1 y lenteja (Len c 1), guisante (Pis s 1), soja, altramuz y sésamo (Ses i 3), entre Ara h 2 y nuez, almendra (197, 198), entre Ara h 3 y soja y avellana (140).

Ara h 8 tiene reactividad cruzada con Bet v 1 por una identidad de secuencia de aminoácidos del 45,9% y como consecuencia de ello, los pacientes presentan polinosis y SAO como síntoma predominante aunque también pueden presentar otra sintomatología alejada de la cavidad oral: flushing, náuseas, vómitos, conjuntivitis, y urticaria (188). También se ha descrito RC entre Ara h 8, soja (Gly m 4) y cereza (Pru av 1).



2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Los frutos secos son una de las causas más frecuentes de reacciones alérgicas por alimentos. Son una causa frecuente de anafilaxia y suelen estar presentes como alérgenos ocultos, siendo por tanto responsables de producir reacciones graves que pueden poner en peligro la vida del paciente. A pesar de que se están investigando nuevos tratamientos para esta enfermedad, el tratamiento de primera elección, es la prevención, evitando la ingestión de los frutos secos causantes de las reacciones lo que supone una importante disminución en la calidad de vida y una gran preocupación para los pacientes y su entorno por el riesgo de presentar reacciones graves. Todo esto sumado a la dificultad diagnóstica por la ausencia de estandarización de los extractos, la existencia de reactividad cruzada entre los frutos secos y a la presencia de atopia latente dificulta enormemente el manejo de estos pacientes. La incorporación del diagnóstico molecular ha supuesto un gran avance permitiendo conocer los alérgenos implicados en las reacciones alérgicas. Todo ello nos ha llevado a investigar y profundizar en el conocimiento de la alergia a frutos secos en nuestro medio y a buscar nuevos patrones de sensibilización y nuevos *clusters* de asociación.

2.2. Objetivos

Los objetivos planteados en esta investigación son:

1. Determinar las características de la alergia a frutos secos en Madrid:
 - Estudiar los frutos secos que con mayor frecuencia producen alergia.
 - Determinar las características clínicas.
 - Definir los patrones moleculares de sensibilización en alergia a frutos secos.
 - Estudiar las correlaciones entre las sensibilizaciones a nivel molecular.
2. Búsqueda de patrones diferenciales según localización geográfica.
3. Describir nuevas entidades en la alergia a frutos secos.



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Diseño del estudio

Se realizó un estudio observacional descriptivo transversal. Fue prospectivo transversal, dado que no se estudió la evolución de los pacientes, sino su historia clínica en un momento puntual. Se analizaron los resultados desde el punto de vista descriptivo y analítico, valorando todos aquellos grupos y subgrupos con relevancia clínica.

Para desarrollar los objetivos del estudio se definieron varias fases:

3.1.1 FASE I: Características de la alergia a frutos secos en Madrid: en esta primera fase se estudiaron pacientes pertenecientes al Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz y se centró en el estudio de las características clínicas, realización de pruebas cutáneas y determinación de IgE específica de esta población así como el estudio de las correlaciones.

3.1.2 FASE II: Búsqueda de patrones geográficos diferenciales en alergia a frutos secos en España: en esta segunda fase se estudiaron los patrones diferenciales en pacientes de Madrid (Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz) y Asturias (Hospital Universitario Central de Asturias), dos regiones de España bien diferenciadas. (Figura 1).



Figura 1. Fase II: Búsqueda de patrones geográficos diferenciales en alergia a frutos secos en España.

3.1.3 FASE III: Búsqueda de nuevos patrones de alergia a frutos secos:

Síndrome pistacho-anacardo: durante el estudio, se detectó un grupo de pacientes con alergia selectiva a pistacho y anacardo por lo que decidimos caracterizar este grupo de pacientes en esta última fase con las características que se definen a continuación.

3.2 Selección de pacientes

- Se estudiaron 83 pacientes con alergia a frutos secos pertenecientes a dos regiones diferentes de España: 55 pacientes del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz de Madrid y 28 pacientes del Hospital Universitario Central de Asturias.

3.2.1 Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión para las **fases I y II** fueron:

- Pacientes diagnosticados de alergia a frutos secos durante el periodo comprendido entre los años 2013 y 2016.
- Haber presentado una historia clara de reacción adversa a frutos secos sugestiva de alergia mediada por IgE, demostración de IgE específica por prueba cutánea o IgE específica sérica y/o prueba de provocación oral siguiendo el algoritmo diagnóstico del comité de reacciones adversas a alimentos de la Sociedad Española de Alergia e Inmunología Clínica (11).

Los criterios de inclusión para la **fase III** fueron:

- Pacientes con alergia selectiva a pistacho-anacardo.
 - Haber presentado una historia clara de reacción adversa a pistacho y/o anacardo sugestiva de alergia mediada por IgE, demostración de IgE específica por prueba cutánea o IgE específica sérica y/o prueba de provocación oral siguiendo con el algoritmo diagnóstico del comité de reacciones adversas a alimentos de la Sociedad Española de Alergia e Inmunología Clínica (11). Los pacientes debían tener estudio negativo mediante prueba cutánea o IgE específica sérica y/o prueba de exposición oral para el resto de frutos secos, cacahuete incluido.
- Los pacientes que hubieran presentado una reacción sistémica con frutos secos, así como aquellos con reacciones típicas, repetidas e inequívocas que presentaran pruebas positivas y/o IgE específica no serían susceptibles a la realización de administración oral controlada para el diagnóstico de alergia a frutos secos.
- Niños y adultos.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Haber firmado el consentimiento informado aprobado por el Comité Ético del Hospital Fundación Jiménez Díaz y de Hospital Universitario Central de Asturias (Anexo 1).

3.2.2 Criterios de exclusión

- Estar embarazada o en periodo de lactancia.
- Padecer una enfermedad cutánea extensa o una enfermedad infecciosa crónica de base.
- Padecer desórdenes psicológicos/psiquiátricos graves.
- Presentar enfermedades que contraindiquen la administración de adrenalina.
- Adicción a drogas y/o alcohol.
- Estar en tratamiento con fármacos betabloqueantes.
- Cualquier condición que pudiera interferir en el cumplimiento del protocolo o que contraindicara la realización de una prueba de provocación oral controlada (199).

3.3 Extracción sanguínea y conservación de muestras

A cada paciente se le realizó una extracción sanguínea de 2 tubos Vacutainer SST® (BD S.A, Madrid, España) con gelosa de 5 ml por venopunción y se mantuvieron a temperatura ambiente (TA) durante una hora para ser posteriormente centrifugados a 2000g durante 10 minutos. El suero resultante se almacenó en alicuotas de 1 ml anonimizadas mediante siglas y números y se congelaron a - 20°C almacenándose en la seroteca del Servicio de Alergología correspondiente.

3.4 Cuestionario clínico-epidemiológico

INFORMACIÓN CLÍNICA

Se diseñó un cuestionario que incluyó los datos de filiación y profesión de cada paciente, así como una serie de variables recogidas tras una extensa anamnesis realizada en la consulta para poder recoger la información de forma estandarizada y así procesar los datos de la información del paciente (Anexo 2). Esta información se recogió para las fases **I** y **II**.

1. Presencia de alergia respiratoria:

- a) Síntomas óculo-nasales y/o asma bronquial.
- b) Época del año en la que el paciente presentaba síntomas: Enero-Febrero, Abril, Mayo-Junio y Septiembre-Octubre.

MATERIAL Y MÉTODOS

2. Presencia de síntomas presentados con la ingesta de alimentos de origen vegetal:

- a) Tipo de síntomas: orales (síndrome de alergia oral), cutáneos (urticaria, angioedema, urticaria de contacto), digestivos (náuseas, vómitos, epigastralgia/pirosis, dolor abdominal, diarrea), respiratorios (asma y/o rinoconjuntivitis), anafilaxia u otros.
- a) Edad de aparición de síntomas.
- b) Tiempo de latencia entre la ingesta del alimento y la aparición de los síntomas: < 5 minutos, 5-30 minutos, 30-60 minutos, >60 minutos)
- c) Requerimiento de tratamiento ambulatorio así como haber precisado medicación durante la reacción y qué tipo de medicación: antihistamínicos, corticoides, adrenalina u otros.
- d) En el caso de que fueran los frutos secos los implicados, especificar la mínima cantidad con la que presentó reacción: como alimento oculto, uno, de 2 a 5, más de 5 o más de 10.
- e) Implicación de cofactor en la reacción alérgica con alimentos de origen vegetal: toma de AINEs (antiinflamatorios no esteroideos), ejercicio físico u otros en las horas previas o posteriores a la reacción con alimentos vegetales.

Para la fase III:

Se recogieron una serie de datos incluyendo los datos de filiación además de otras variables recogidas durante una anamnesis detallada en la consulta:

1. Presencia o ausencia de alergia respiratoria.
2. Síntomas presentados con la ingesta de pistacho y/o anacardo: orales (síndrome de alergia oral), cutáneos (urticaria, angioedema, urticaria de contacto), digestivos (náuseas, vómitos, epigastralgia/pirosis, dolor abdominal, diarrea), respiratorios (asma y/o rinoconjuntivitis), anafilaxia u otros.
3. Ausencia de síntomas con otros frutos secos.

El anonimato de cada paciente se garantizó mediante la identificación de los cuestionarios con siglas y números, que coincidía con el número de suero, de cada paciente incluido en el estudio.

3.5 Pruebas cutáneas (SPT y SPPT)

Las pruebas cutáneas se realizaron siguiendo las recomendaciones de la EAACI (European Academy of Allergy and Clinical Immunology, EAACI) (200).

Previo a la realización de las mismas, se comprobó que el paciente no hubiera realizado tratamiento alguno que pudiera alterar el resultado de las pruebas (201).

La técnica consiste en la realización de la prueba cutánea en la superficie anterior del antebrazo y realizar una pequeña punción mediante una única lanceta para cada prueba (ALK-LANCET, ALK-Abelló, Denmark) evitando así la contaminación con un análisis posterior de los resultados transcurridos 15 minutos.

En las pruebas cutáneas intraepidérmicas (prick test) se deposita una pequeña cantidad de extracto mientras que para la realización de pruebas cutáneas con alimento natural, se utilizó el método prick-prick, que consiste en pinchar con la misma lanceta primero el alimento e inmediatamente después la piel del paciente.

Para ambas pruebas, se utilizó hidrocloruro de histamina (10 mg/ml) como control positivo y cloruro de sodio (NaCl al 0.9%) como control negativo (C.B.F. LETI, A; Tres cantos, España).

Fueron consideradas pruebas positivas aquellas que presentaron una pápula de diámetro 3 mm mayor que la obtenida con el control negativo (202). Se marcó el contorno de las pápulas con un rotulador de punta fina para poder después medir su área.

Todas las pruebas cutáneas fueron realizadas por el mismo investigador, quien midió el área de la pápula de las pruebas consideradas positivas.

Para las **fases I, II y III** se realizaron pruebas cutáneas intraepidérmicas (SPT) con extractos comerciales de frutos secos (C.B.F.LETI, A; Tres cantos, España.), así como pruebas cutáneas intraepidérmicas mediante prick prick (SPPT) con frutos secos (semilla de girasol, nuez, pistacho, almendra, avellana, cacahuete, piñón, castaña y anacardo). Además, se realizaron pruebas cutáneas intraepidérmicas (SPT) con extractos comerciales de frutas, profilina, LTP, y pólenes (ALK-Abelló, Madrid, Spain) (Tabla 15).

MATERIAL Y MÉTODOS

Polen/alimento	Laboratorio	Concentración
<i>Lolium perenne</i>	ALK- Abelló	30 HEP
<i>Cupressus Sempervivens</i>	ALK- Abelló	30 HEP
<i>Betula verrucosa</i>	ALK- Abelló	30 HEP
<i>Olea europeae</i>	ALK- Abelló	30 HEP
<i>Platanus acerifolia</i>	ALK- Abelló	30 HEP
<i>Artemisia vulgaris</i>	ALK- Abelló	30 HEP
<i>Parietaria judaica</i>	ALK- Abelló	30 HEP
<i>Plantago lanceolata</i>	ALK- Abelló	30 HEP
<i>Salsola kali</i>	ALK- Abelló	30 HEP
Profilina	ALK- Abelló	50 µg /ml Pho d 2
LTP	Bial-Aristegui	100 µg /ml
Cacahuete	Laboratorios Leti SLU	2000 µg prot/ml
Avellana	Laboratorios Leti SLU	3400 µg prot/ml
Nuez	Laboratorios Leti SLU	500 µg prot/ml
Almendra	Laboratorios Leti SLU	7000 µg prot/ml
Pistacho	Laboratorios Leti SLU	4500 µg prot/ml
Piñón	Laboratorios Leti SLU	3500 µg prot/ml
Semilla de girasol	Laboratorios Leti SLU	1200 µg prot/ml
Castaña	Laboratorios Leti SLU	1800 µg prot/ml
Anacardo	ALK- Abelló	5% (p/v)
Melocotón	ALK- Abelló	30 µg /ml Pru p 3
Plátano	ALK- Abelló	0,118 mg/ml
Manzana	ALK- Abelló	5% (p/v)
Kiwi	ALK- Abelló	5% (p/v)
Melón	ALK- Abelló	5% (p/v)
Control negativo	Laboratorios Leti SLU	NaCl al 0.9%
Histamina	Laboratorios Leti SLU	10 mg/ml

Tabla 15. Pruebas cutáneas con extractos de pólenes/proteínas purificadas y alimentos vegetales. Prot: proteína, HEP: unidad de punción histamina equivalente.

3.6 Determinación de IgE específica mediante ImmunoCAP

La determinación de IgE específica se realizó mediante un analizador de enzimoimmunoensayo con lectura fluorométrica, ImmunoCAP System FEIA (Thermo-Fisher Scientific, Uppsala, Suecia) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los

resultados de los niveles de IgE específica se expresaron en kU/l, considerándose positivos valores por encima de 0.35 kU/l. No obstante se valoraron valores superiores a 0,1 kU/l por si fueran de interés.

En nuestro estudio, se realizaron determinaciones de IgE específica para extractos completos de frutos secos (avellana, cacahuete, almendra, pistacho, castaña, nuez, anacardo y piñón) y recombinantes (Pru p 3, Bet v 1, Ara h 9, Cor a 8, Phl p 12, Art v 3, Ana c 2, Ber e 1, Ara h 1, Ara h 2 y Ara h 3).

3.7 Determinación de IgE específica a un panel de alérgenos purificados por microarray

Se realizaron determinaciones de IgE específica con extractos completos y frente a un panel de alérgenos utilizando el biochip ImmunoCAP-ISAC® (Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Suecia). La presencia de IgE específica frente a más de un centenar de alérgenos se analizó mediante una micromatriz de proteínas, el ISAC-112 (Immuno Solid-phase Allergen Chip). La incubación de las zonas de reacción del biochip se realizó con 30µl de suero durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron lavados durante 30 minutos con tampón TBS-T (cloruro de sodio 150 mM, Tris base 10 mM, y Tween 20 0,5%, pH 8,0). Durante 60 minutos se incubaron con un anticuerpo anti-IgE humano (ThermoFisher Scientific) marcado con fluoróforo Cy3 para el posterior escaneado del biochip que fue analizado mediante un programa informático. Mediante la calibración del suero analizado se creó una curva patrón cuyas intensidades fluorescentes se transformaron en concentraciones de IgE específica en unidades ISU (ISAC Standardised Units) que correspondían a niveles de anticuerpos IgE en rangos de ng/ml (límite de detección: 0.01 ISU-E) (203-205).

3.8 Pruebas de provocación

Las pruebas de provocación con frutos secos se realizaron en técnica de provocación oral abierta con el fruto seco implicado siguiendo la metodología descrita en la Sociedad Española de Alergia e Inmunología Clínica (206).

Aquellos pacientes que hubieran presentado reacciones inequívocas y repetidas con frutos secos, así como los que hubieran presentado reacciones sistémicas con pruebas

cutáneas y/o IgE específica positivas no fueron candidatos a la prueba de provocación (por protocolo).

3.9 Preparación de extractos de alimentos para purificación de albúminas 2S

Se prepararon extractos procedentes de pistacho, anacardo, avellana, piñón, semilla de girasol, de mostaza y de tomate por congelación en nitrógeno líquido y trituración con ayuda de un mortero hasta la obtención de un polvo fino. Dicho polvo se homogeneizó en bicarbonato amónico 0.2 M, (pH 8.0) con PMSF 1 Mm y se agitó mecánicamente durante 1 h a 4°C. Se centrifugó a 20,000 g durante 30 min a 4°C, se filtró y resuspendió en acetona a -60°C, siendo posteriormente centrifugado a 9000 g durante 15 min a 4°C. Este proceso se repitió dos veces más y finalmente se desechó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en bicarbonato amónico 20 mM, (pH 8.0) y fue almacenado a -20°C. La cuantificación de la concentración de proteína se realizó mediante el método Lowry (207).

3.10 Purificación de albúminas 2S

Las albúminas 2S de los extractos de frutos secos fueron inicialmente aisladas por cromatografía de exclusión por tamaño utilizando columnas Sephadex® G-50 equilibrada con 0.2 M de bicarbonato amónico pH 8.0 a un flujo de 0.6 ml/min. Tras el análisis mediante SDS-PAGE, las fracciones proteicas de bajo peso molecular se agruparon para un segundo paso de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC-RP) utilizando una columna Ultrapore C-18 con un gradiente de acetonitrilo de 0 a 60% a un flujo de 0.5 ml/min. Las fracciones fueron de nuevo analizadas mediante SDS-PAGE.

Además de los extractos de anacardo y pistacho, con esta metodología se obtuvieron las albúminas 2S de avellana, piñón, semillas de tomate, mostaza y girasol que junto con Ara h 2 comercial se utilizaron en este estudio. (Figura 2).

MATERIAL Y MÉTODOS

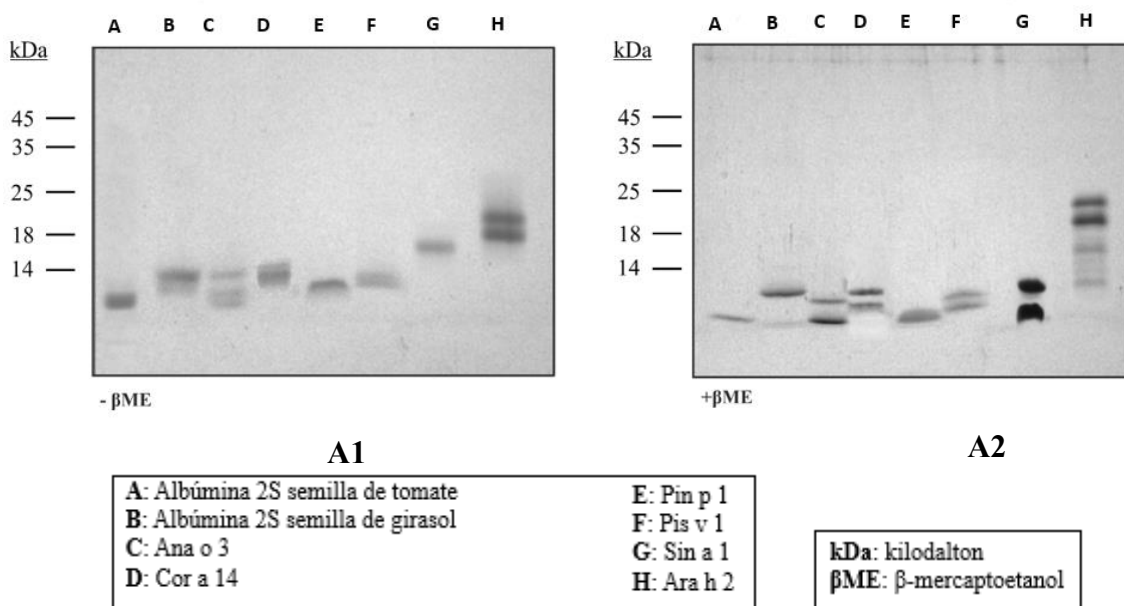


Figura 2. Tinción CBS de albúminas 2S purificadas de semillas de tomate y girasol, anacardo, avellana piñón, pistacho, mostaza y cacahuete. A1. Con β-ME y A2 sin β-ME.

3.11 Identificación de albúminas 2 S mediante espectrometría de masas

La identificación de proteínas se realizó mediante espectrometría de masas (MS). Para este procedimiento se realizó SDS-PAGE en condiciones estériles. El gel se tiñó con azul de Coomassie coloidal y se conservó en agua Milli-Q®. Las bandas de interés se extrajeron del SDS-PAGE para realizar la identificación mediante MS en el Servicio de Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid. El análisis de las proteínas purificadas se realizó a través del equipo MALDI-TOF Bruker-Reflex IV (Bruker-Franzer Analytic, Bremen, Alemania) y del espectrómetro de masas 4800 Proteomics Analyzer (AB SCIEX) el cual permite conocer la masa molecular de las proteínas y su patrón de huella peptídica.

3.12 Procedimientos analíticos o Electroforesis en geles de poliacrilamida

La pureza de la proteína, así como el cálculo de su masa molecular fueron realizados mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 17%. Las muestras se diluyeron en

tampón de carga y se desnaturalizaron durante 10 min a 90 °C. Las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie R-250 (Sigma-Aldrich). La determinación de la concentración de proteína se llevó a cabo mediante análisis de aminoácidos (208).

3.13 Ensayos inmunológicos o ensayos de Inmunodetección

Después de separar las proteínas del extracto mediante SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham Biosciences, Barcelona, España). La inmunodetección de las proteínas se realizó utilizando un suero individual o un pool de ellos (dilución 1/5). La banda de IgE se detectó mediante un anticuerpo monoclonal anti-IgE de ratón (dilución 1:5000) proporcionado por ALK-Abelló (Madrid, España), seguido de una incubación con IgG policlonal de rábano IgG (dilución 1:3000; Pierce, Rockford, Illinois). La señal de quimioluminiscencia se desarrolló con el reactivo ECL-Western Blotting (GE HealthCare) y se detectó mediante un analizador de imagen luminiscente LAS3000 (GE HealthCare). La cuantificación de la señal se realizó triplicada utilizando el programa informático Multigauge V3.0.

Para el ensayo de inhibición de la inmunodetección de inhibición, un suero individual o un pool de sueros de igual volumen fue preincubado con 5 µg de proteína aislada o 500 µg de los correspondientes extractos a temperatura ambiente durante 2 horas utilizando PBS como control negativo (la dilución final del pool de sueros o del suero individual fue 1/5). El resto de los pasos se realizaron como se indicó anteriormente.

3.14 IgE directo y ELISA inhibición

Para la realización del ELISA directo se utilizaron placas de 96 pocillos de poliestireno de alta afinidad (Costar®) y se tapizaron con proteína purificada (2 µg/ml en 20mM Tampón bicarbonato, pH 7.6, 100 µL/pocillo) y después se incubaron durante la noche a 4°C. Los pocillos se lavaron con PBS-T y fueron bloqueados con 3% leche desnatada en polvo en PBS-T. Para la realización de ELISA de inhibición, los sueros se preincubaron con proteínas purificadas (0.002-2 µg), extractos de frutos secos (500 µg) o BSA como control negativo a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla de inhibición o el suero completo (dilución 1/5, 3% leche desnatada en PBS-T) se añadió al pocillo tapizado e incubado a 37°C durante 2 horas. Los pocillos se lavaron con PBS-T y se incubaron primero con un anticuerpo anti-IgE de ratón y posteriormente con un anticuerpo anti-IgG de ratón unido a HRP, ambos durante 1 hora a 37°C con lavados de PBS-T después de

MATERIAL Y MÉTODOS

cada incubación. Las bandas de IgE se detectaron utilizando p-fenilendiamina (Sigma) en citrato fosfato 0,05 M (Sigma) y la reacción se detuvo añadiendo 4M HCl. La absorbancia se midió a 492 nm en un lector de absorbancia iMark Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad) y las medidas de unión no específicas se eliminaron substrayendo la absorbancia de los pocillos controles no tapizados. Se consideraron reacciones positivas cuando la absorbancia a 492 nm fue mayor que tres veces la desviación estándar de la absorbancia media obtenida con donantes no atópicos.

El porcentaje de inhibición de las bandas de IgE se calculó según la siguiente fórmula:
$$\text{inhibición (\%)} = [1 - (\text{OD}_{492\text{nm}} \text{ con inhibidor} / \text{OD}_{492\text{nm}} \text{ sin inhibidor})] \times 100.$$

3.15 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Las variables cualitativas se presentaron como porcentajes. Las variables cuantitativas se expresaron con los valores de la media y la desviación estándar, excepto los niveles de IgE específica que se describieron con la mediana, el percentil 25 (Q1) y el percentil 75 (Q3). La comparación de frecuencias y porcentajes se llevó a cabo mediante el test de Chi-cuadrado (X^2) o prueba exacta de Fisher. Las comparaciones de variables cuantitativas se llevaron a cabo mediante la prueba de Mann-Whitney. Todas las comparaciones se realizaron con un nivel de significación de 0.05. El grado de concordancia entre dos pruebas se evaluó mediante el índice Kappa. El coeficiente de correlación se calculó mediante el coeficiente de Pearson. Dado que las distribuciones de las variables presentaban asimetrías positivas bastante fuertes, los datos fueron transformados con logaritmos.



4. RESULTADOS

4.1 FASE I: Características de la alergia a frutos secos en Madrid

4.1.1 Pacientes

En esta fase se incluyeron un total de 49 pacientes pertenecientes al Hospital Fundación Jiménez Díaz (Madrid) con historia inequívoca de alergia a frutos secos por anamnesis y siguiendo el diagnóstico del comité de reacciones adversas a alimentos de la SEAIC (11). De acuerdo con esto, se definieron las características clínicas y moleculares de nuestra población principal de estudio.

4.1.1.A Sexo y edad

La edad media de los pacientes fue $30,1 \pm 13,5$ años con una edad mínima y máxima de 3 y 66 años respectivamente. El 46,9% eran mujeres (23 de los 49 pacientes) y 53,1% eran varones (26 de los 49 pacientes). 8 pacientes menores de 18 años participaron en el estudio.

4.1.2 Cuestionario clínico-epidemiológico

4.1.2.A Alergia respiratoria

4.1.2.A.1 Síntomas oculo-nasales y/o asma bronquial

El 81,6% del total de los pacientes presentaron alergia respiratoria. Todos ellos presentaron asma bronquial como patología concomitante.

4.1.2.A.2 Época del año en la que presentaron síntomas

Del 81,6% de pacientes que presentaron síntomas respiratorios en Madrid (40 pacientes), un 60% (24 pacientes) presentó síntomas durante los meses de Mayo-Junio, un 35% (14 pacientes) en Enero-Febrero, un 25% (10 pacientes) en Abril y un 12,5% (5 pacientes) en Septiembre-Octubre.

RESULTADOS

4.1.2.B Síntomas con frutos secos, así como con otros alimentos vegetales

4.1.2.B.1 Frutos secos

Una vez realizado el diagnóstico definitivo, los frutos secos más frecuentemente implicados en producir síntomas de alergia fueron la nuez (32 pacientes-65,3%) seguido de la avellana (28 pacientes-57,1%), cacahuete (23 pacientes-46,9%) y almendra (21 pacientes-42%). Otros frutos secos produjeron síntomas con menor frecuencia (Figura 3).

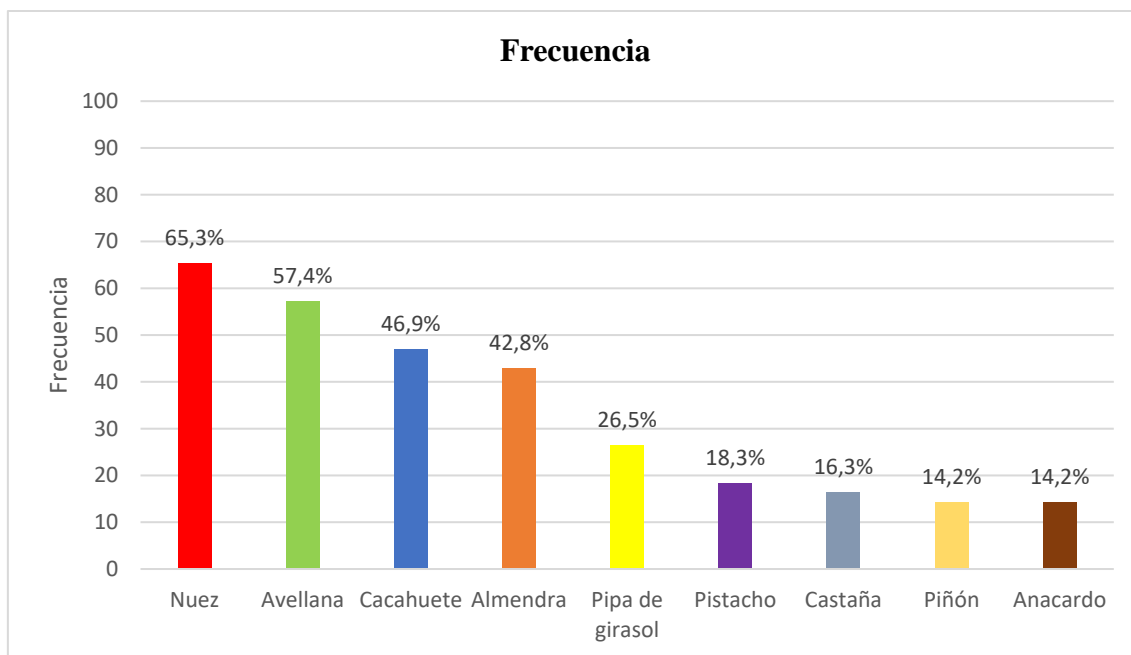


Figura 3. Frecuencia de pacientes que presentaron síntomas tras el diagnóstico definitivo.

Con respecto a la sintomatología presentada por los pacientes, un 73,4% presentaron síntomas sistémicos (SS) tras la ingestión (36 de los 49 pacientes) y un 26,5% (13 de los 49 pacientes) tuvieron síntomas localizados en la cavidad oral (SAO). La nuez fue el fruto seco que con mayor frecuencia produjo síntomas sistémicos (22 pacientes) seguido de la avellana (19 pacientes) y del cacahuete (18 pacientes). Con respecto al fruto seco responsable de producir síntomas localizados en la cavidad oral, el más frecuente fue la nuez (10 pacientes) (Figura 4).

RESULTADOS

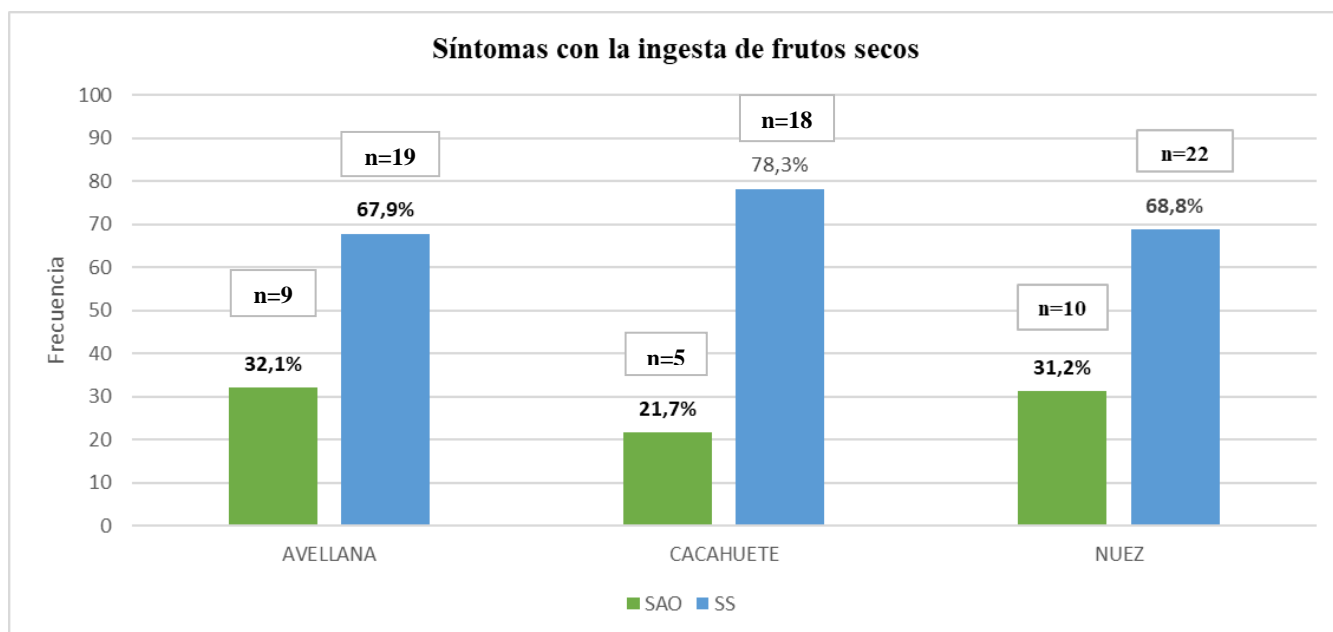


Figura 4. Frecuencia de pacientes que presentaron síntomas con los frutos secos más frecuentemente implicados. SAO: síndrome de alergia oral. SS: síntomas sistémicos. n: número de pacientes.

4.1.2.B.2 Otros alimentos vegetales

El 81,6 % de los pacientes presentaron síntomas con otros alimentos de origen vegetal. El más frecuente fue el melocotón (28 pacientes-57,4%), seguido del kiwi y del melón (16 pacientes-32,6% ambos) (Figura 5).

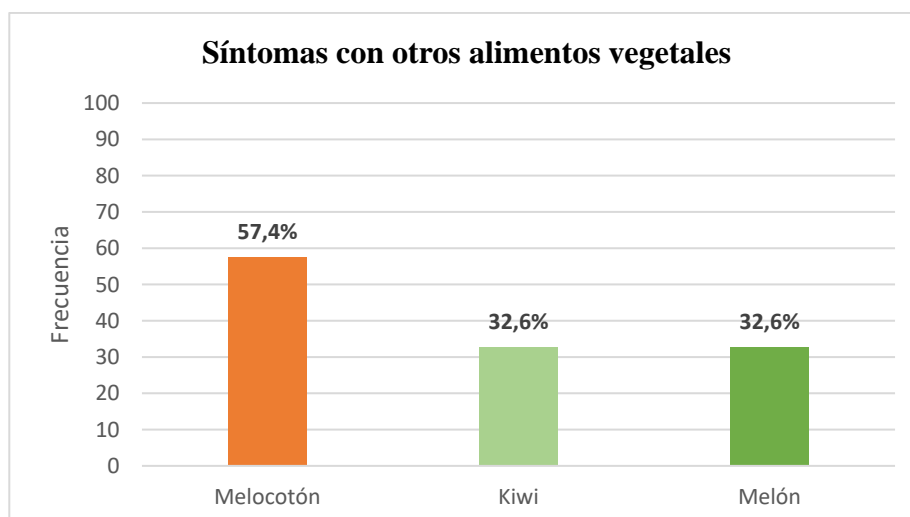


Figura 5. Frecuencia de pacientes que presentaron síntomas con los alimentos de origen vegetal con mayor frecuencia implicados.

RESULTADOS

4.1.2.C Edad de comienzo de síntomas

La edad media de inicio de los síntomas fue de 20,73 años con una edad mínima y máxima de 2 y 56 años respectivamente.

4.1.2.D Tiempo de latencia entre la ingesta del alimento y la aparición de los síntomas

Un 46,9% de los pacientes presentaron la reacción alérgica tras la ingesta de frutos secos los primeros 5 minutos. Un 36,7% entre 5-30 minutos, un 6,2% entre 30-60 minutos y un 10,2% después de la primera hora (Figura 6).

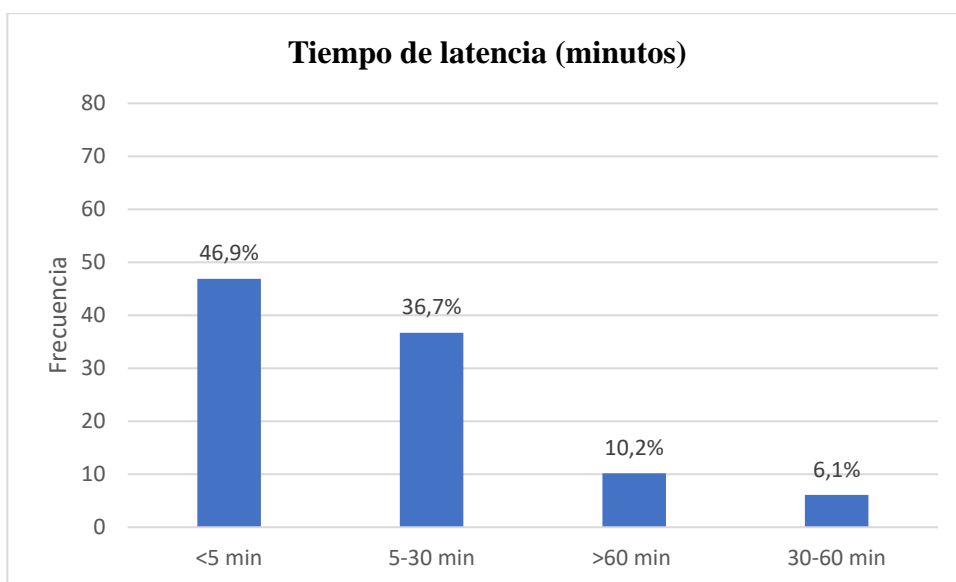


Figura 6. Frecuencia de pacientes que presentaron síntomas en distintos tiempos tras la ingestión de frutos secos.

4.1.2.E Requerimiento de tratamiento ambulatorio

Únicamente 16 pacientes (32,6%) de los que presentaron una reacción alérgica precisaron atención en Urgencias mientras que 33 pacientes (67,3%) no lo requirieron.

25 pacientes (51%) recibieron tratamiento durante la reacción alérgica, los antihistamínicos en asociación con corticoides im (12 pacientes-48%) fueron los fármacos administrados con mayor frecuencia, seguido de antihistamínicos (10 pacientes-

RESULTADOS

40%), corticoides im y adrenalina (3 pacientes-12%) y otros distintos a los mencionados (2 pacientes-8%) (Figura 7).

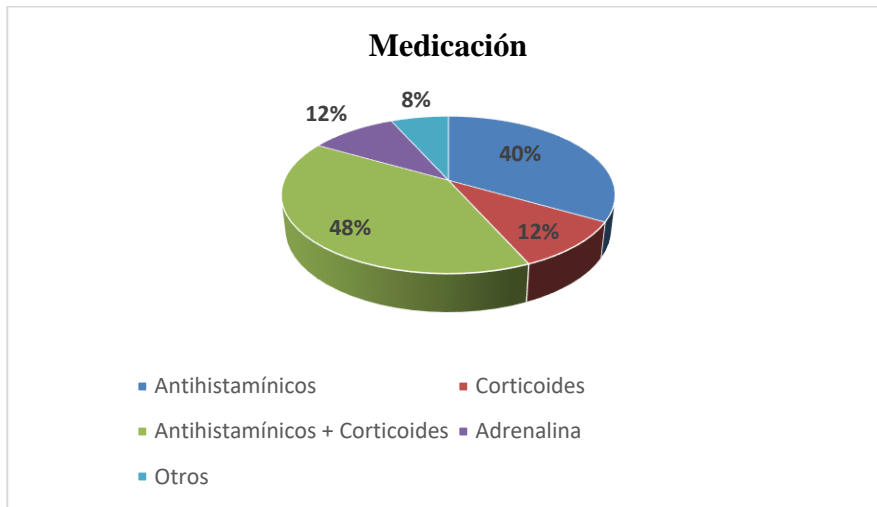


Figura 7. Frecuencia de pacientes que recibieron distintos tratamientos durante la reacción alérgica.

4.1.2.F Cantidad mínima de frutos secos causante de la reacción

Un 32,6% de los pacientes presentó síntomas al ingerir entre 2 y 5 piezas, siendo la cantidad que con mayor frecuencia produjo síntomas. Muy próximo estuvo el grupo de pacientes que presentó síntomas con una pieza (30,6%), un 14,2% presentaron síntomas con 5-10 piezas y un 12,2% presentaron síntomas al ingerir el fruto seco como alimento oculto (Figura 8).

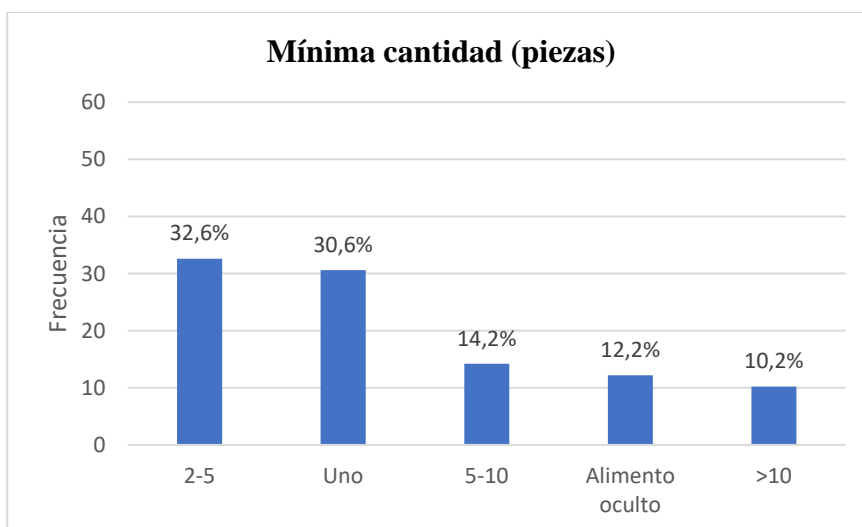


Figura 8. Frecuencia de pacientes que presentaron síntomas con la mínima cantidad de frutos secos.

RESULTADOS

4.1.2.G Implicación de cofactor en la reacción alérgica con alimentos de origen vegetal

De los 49 pacientes, sólo 1 de ellos (2%) asoció la presencia de cofactor a la reacción alérgica con frutos secos, siendo el ejercicio físico el implicado.

4.1.3 Pruebas cutáneas

4.1.3.A Pruebas cutáneas con pólenes

Un 77,5% de los pacientes estaban sensibilizados a pólenes de gramíneas y un 47% a polen de abedul mientras que un 44,5% estaban sensibilizados a ambos pólenes. El 80,4% de los pacientes estaban sensibilizados a polen de arizónica, seguido de plátano de sombra (70%) y olivo (69,5%). El polen de plantago fue el responsable del 82,6% de las sensibilizaciones seguido de salsola (58,6%), parietaria (56,2%) y artemisia (48,9%) (Figura 9).

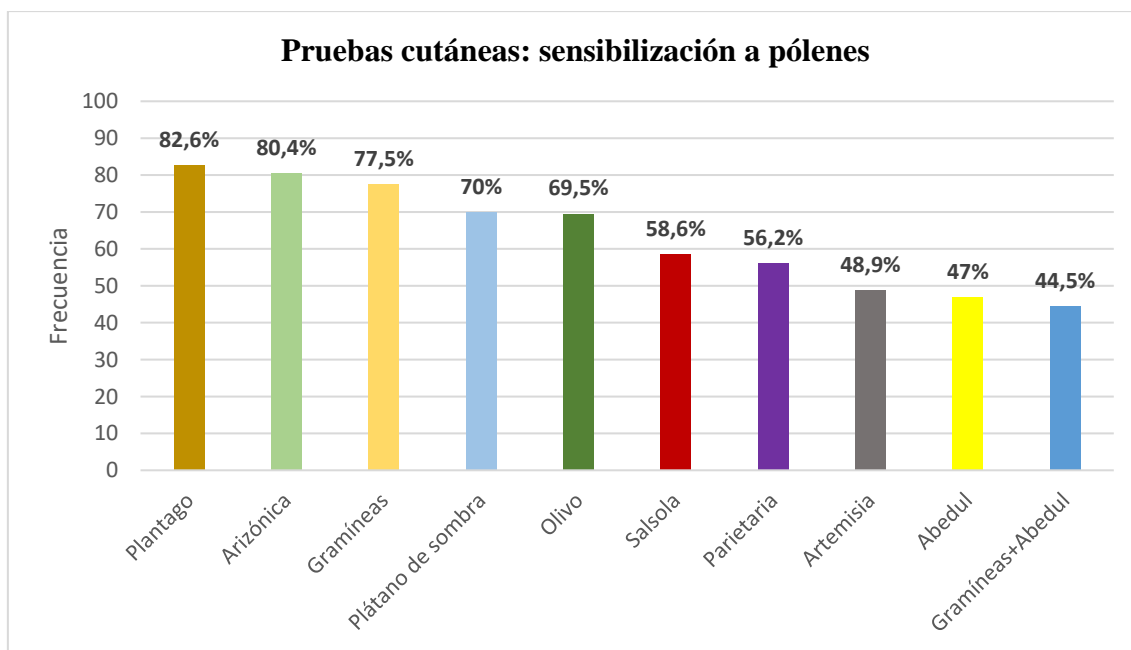


Figura 9. Frecuencia de sensibilización a pólenes en pacientes con alergia a frutos secos.

4.1.3.B Pruebas cutáneas con LTP y profilina

37 pacientes (75,5%) estaban sensibilizados a LTP, 17 pacientes (34,6%) lo estaban a profilina mientras 14 pacientes (28,6%) estaban sensibilizados a ambas (Figura 10).

RESULTADOS

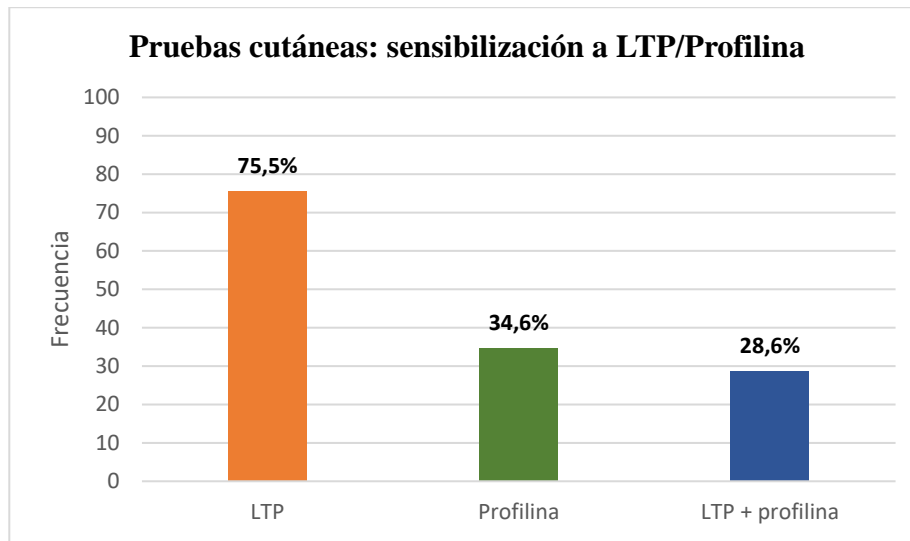


Figura 10. Frecuencia de sensibilización a LTP y/o profilina en pacientes con alergia a frutos secos.

4.1.3.C Pruebas cutáneas con alimentos

4.1.3.C.1 Pruebas cutáneas con frutos secos

El fruto seco que produjo mayor frecuencia de resultados positivos con extractos comerciales fue el pistacho (77,5%) seguido en orden de frecuencia del cacahuete y piñón (69,3%), avellana (68,2%) castaña (65,3%), nuez (61,2%), semilla de girasol y almendra (53%) (Figura 11).

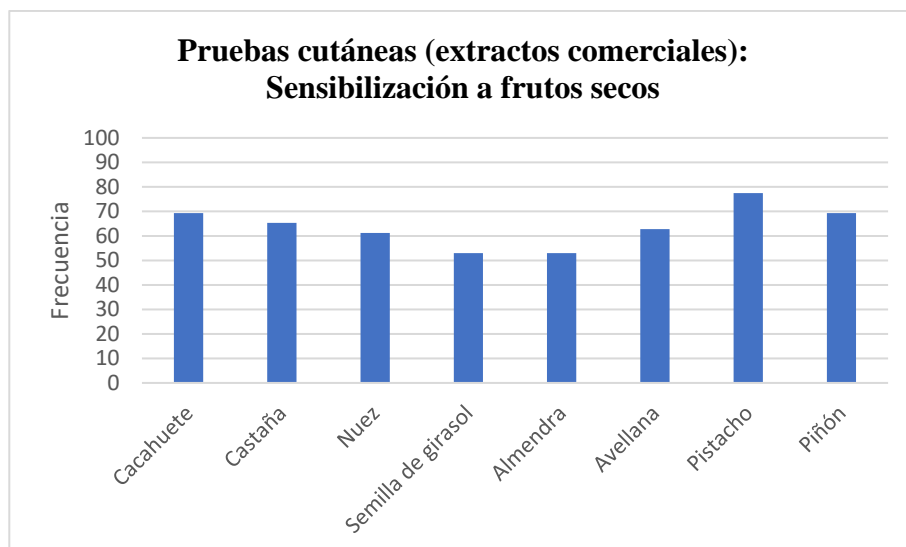


Figura 11. Frecuencia de sensibilización a frutos secos mediante prueba cutánea (extracto comercial).

RESULTADOS

Del total de los pacientes diagnosticados a cada uno de los frutos secos, todos ellos presentaron prueba cutánea positiva para pipa de girasol y para pistacho, 87,5% para castaña, 86,9% para cacahuete, 85,7% para piñón, 78% para nuez, 64,2% para avellana y 57,14% para almendra (Figura 12).

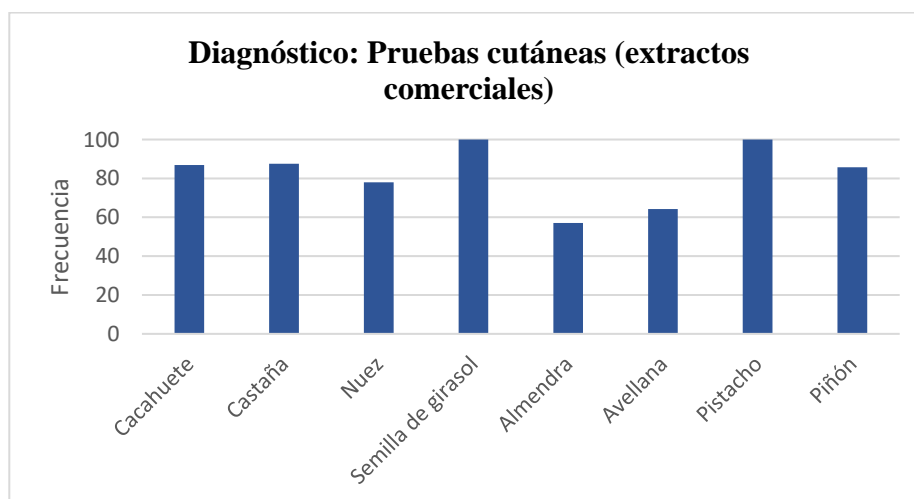


Figura 12. Frecuencia de pacientes sensibilizados a frutos secos mediante prueba cutánea (extracto comercial) tras el diagnóstico.

4.1.3.C.2 Pruebas cutáneas con frutas

El melocotón fue la fruta que produjo mayor frecuencia de respuestas positivas (75%) seguido del kiwi (51%), melón (46,9%), manzana (22,4%) y plátano (8,1%) (Figura 13).

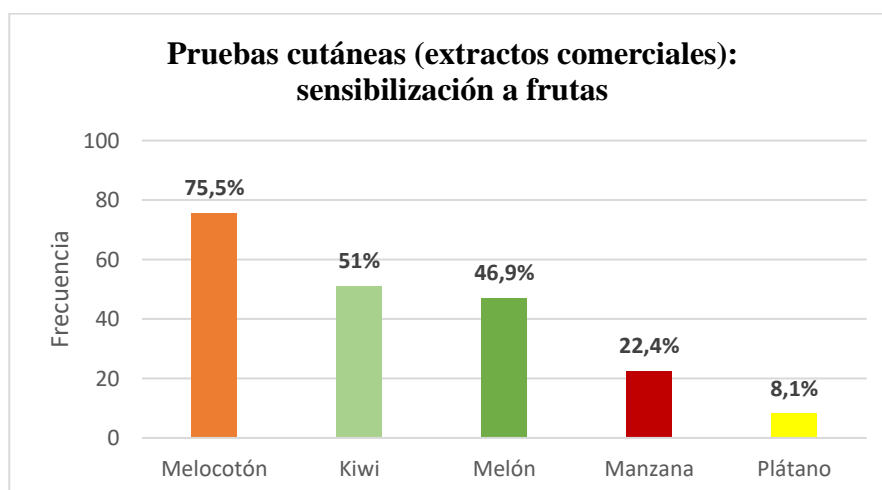


Figura 13. Frecuencia de sensibilización a frutas mediante prueba cutánea (extracto comercial).

RESULTADOS

4.1.4 Determinación de IgE específica

Véase Anexo 3 donde se encuentran los niveles de IgE específica determinados mediante esta técnica.

4.1.4.A ImmunoCAP

4.1.4.A.1 Sensibilización a extractos completos

La determinación de IgE específica mediante CAP fue positiva en mayor número de pacientes con alergia a cacahuete (95,6%), seguido de nuez (90,6%), almendra (90,4%), castaña (87,5%), avellana (87,5%), pistacho (55,5%), anacardo y piñón (42,8%) (Figura 14).

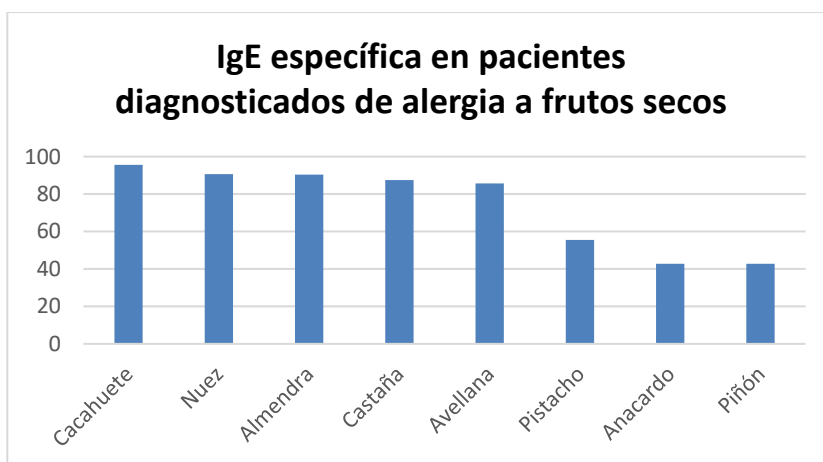


Figura 14. Frecuencia de sensibilización a frutos secos mediante IgE específica (extractos completos).

4.1.4.A.2 Patrón de sensibilización molecular

El 71,4% de los pacientes estaban sensibilizados a Pru p 3 seguido de Ara h 9 (61.2%), Cor a 8 (44,9%), Phl p 12 (20,4%) y Bet v 1 (12%).

El porcentaje de sensibilización a LTP era mayor que la sensibilización a Phl p 12 y a Bet v1 (LTP- 71,4%; Phl p 12-20,4% ; Bet v 1-12%; $p < 0.05$) (Figura 15).

RESULTADOS

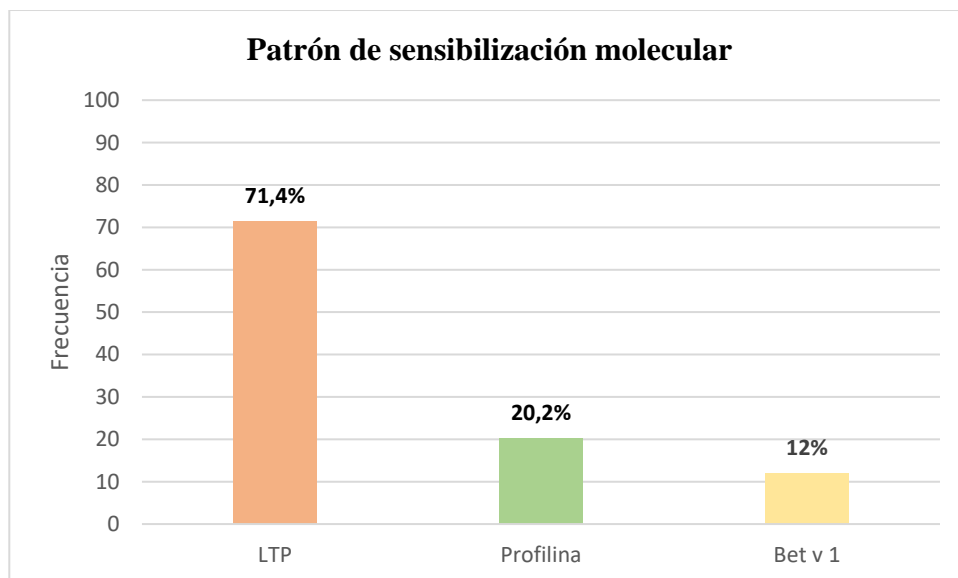


Figura 15. Frecuencia de pacientes con alergia a frutos secos que presentan un específico patrón molecular.

Este patrón molecular de sensibilización se objetivó en los pacientes con alergia a nuez (78,0% LTP vs. 18,7% -Phl p 12 vs. 12,5%- Bet v 1), avellana (78,6%- LTP vs. 18%- Phl p 12 vs. 12,0% Bet v 1), cacahuete (78,6%- LTP vs. 13%- phl p 12 vs. 8,7%- Bet v 1) y almendra (76,2%- LTP vs.23,8 %- phl p 12 vs. 9,5%- Bet v 1) que fueron los frutos secos más frecuentemente implicados en producir reacciones alérgicas (Figura 16).

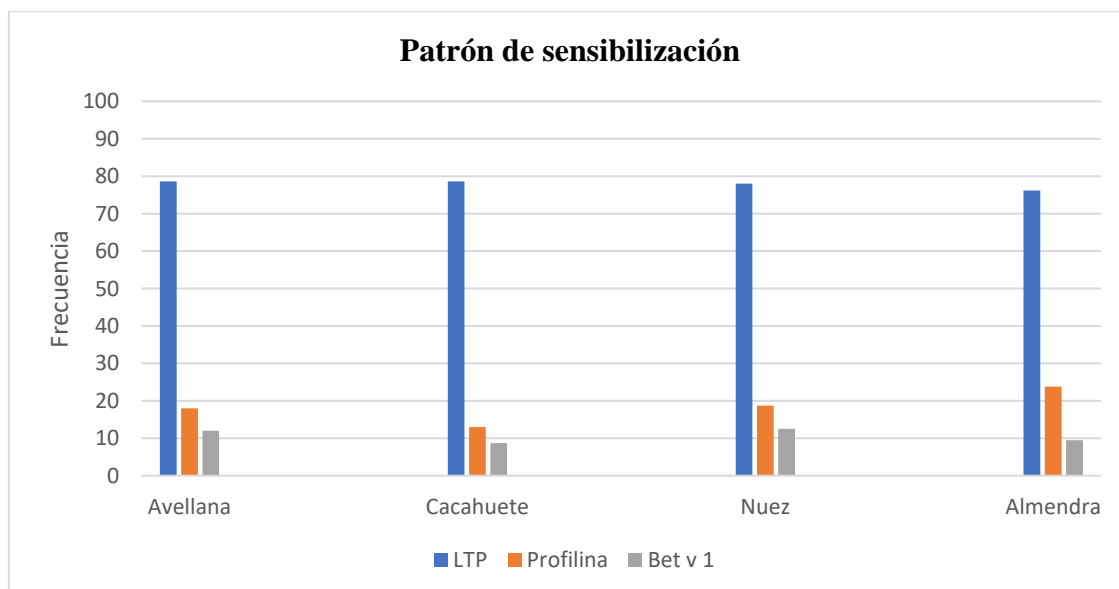


Figura 16. Frecuencia de pacientes diagnosticados de alergia a frutos secos que presentan un patrón molecular de sensibilización específico.

RESULTADOS

4.1.4.A.3 Alergia a cacahuete y sensibilización a Ara h 1, Ara h 2 y Ara h 3

De los 23 pacientes diagnosticados de alergia cacahuete, un 95,6% (22 pacientes) presentaron positividad para cacahuete (extracto completo), 8,7% (2 pacientes) para las tres proteínas Ara h 1, Ara h 2 y Ara h 3, para Ara h 2 y Ara h 3 de forma individual y un 13% (3 pacientes) para Ara h 1.

Con respecto al patrón de alergia a cacahuete según la edad, el 82,6% (19 pacientes) con alergia a cacahuete eran adultos (≥ 18 años), 18 pacientes (94,7%) presentaban positividad para cacahuete (extracto completo), 15 (78,9%) para Ara h 9 y ninguno de ellos para los alérgenos purificados (Ara h 1, Ara h 2 y Ara h 3). Sin embargo 4 pacientes (17,4%) presentaban una edad ≤ 18 años. Todos ellos presentaban positividad para cacahuete (extracto completo), 2 pacientes (50%) para Ara h2, Ara h 3, Ara h 9 y 3 pacientes (75%) para Ara h 1.

Curiosamente, los dos pacientes con IgE específica para cacahuete de 100 kU/l presentaron los niveles más elevados para Ara h 1, Ara h 2 y Ara h 3.

4.1.4.A.4 Sensibilización a otros componentes moleculares

La sensibilización a Ana c 2 y a Ber e 1 fue baja; 7 pacientes (18%) estaban sensibilizados a Ana c 2 y sólo 1 paciente (2%) a Ber e 1.

4.1.4.B Microarray

Véase Figura 17.

4.1.4.B.1 Sensibilización a pólenes

En nuestra población de estudio un 81,6 % de los pacientes eran polínicos. El 85,7% de los pacientes estaban sensibilizados al grupo 1 de gramíneas (Cyn d 1/Phl p 1), 62,8% al grupo 5 (Phl p 5), 58,3% al grupo 4 (Phl p 4), 52,7% al grupo 2 (Phl p 2), 50 % al grupo 6 (Phl p 6) y un 2,7% a proteínas homólogas a Ole e 1 (Phl p 11).

La mayoría de los pacientes estaban sensibilizados a Ole e 1 (61,1%) seguido de Pla a 2 (50%), Pla a 1 (30,5%). El 11,1% de los pacientes estaba sensibilizado a Art v 1 y Sal k 1.

RESULTADOS

4.1.4.B.2 Sensibilización a marcadores de reactividad cruzada

4.1.4.B.2.A Sensibilización a LTP

Un 61,1% de los pacientes estaban sensibilizados a Pru p 3, seguido de un 50% a Cor a 8, un 47,2% a Pla a 3 y Art v 3 y un 41% a Ara h 9 (Figura 21). El 2,7% de los pacientes presentaban sensibilizados a todas ellas (Figura 18).

4.1.4.B.2.B Sensibilización a Profilina

Un 38% de los pacientes estaba sensibilizado a Hev b 8 y Mer a 1, seguido de un 35,1% a Bet v 2, 31,4% a Phl p 12 y un 2,7% a Ole e 2.

4.1.4.B.2.C Sensibilización a CCD

Sólo 6 pacientes (16,6%) estaban sensibilizados a MUXF3.

4.1.4.B.2.D Sensibilización a Polcalcina

El 11,1% (4 pacientes) estaban sensibilizados a Bet v 4 y a Phl p 7.

4.1.4.B.2.E Sensibilización a PR-10

5,5% de los pacientes estaban sensibilizados a Cor a 1, Mal d 1, Aln g 1, un 5,2% a Bet v 1 y un 2,7% a Pru p 1. Ninguno de los pacientes estaba sensibilizado a Ara h 8 ni a Gly m 4.

4.1.4.B.3 Especies por componentes

4.1.4.B.3.A Albúminas 2S

El 16,6% de los pacientes estaban sensibilizados a Ses i 1, un 8,3% a Ara h 6, un 5,5% a Jug r 1 y un 5,4% a Fag e 2. Ninguno de los pacientes estaba sensibilizado a Ara h 2 ni a Ber e 1.

4.1.4.B.3.B Globulina 11S y vicilinas 7S

Un 2,7% de los pacientes estaban sensibilizados a Ana o 2. No hubo ningún paciente que presentara sensibilización a Ara h 1, Ara h 3 ni a Cor a 9.

4.1.4.B.3.C Otros

El 2,7% de los pacientes estaban sensibilizados a Gly m 5 mientras que no hubo ninguno sensibilizado a Gly m 6. Un 13,5% los pacientes estaba sensibilizado a Act d 1 y un 2,7%

RESULTADOS

a Act d 5. Un 8,1% de los pacientes presentaron sensibilización a Tri a 14 y un 2,7% a Tri a 19 y Tri a aA.

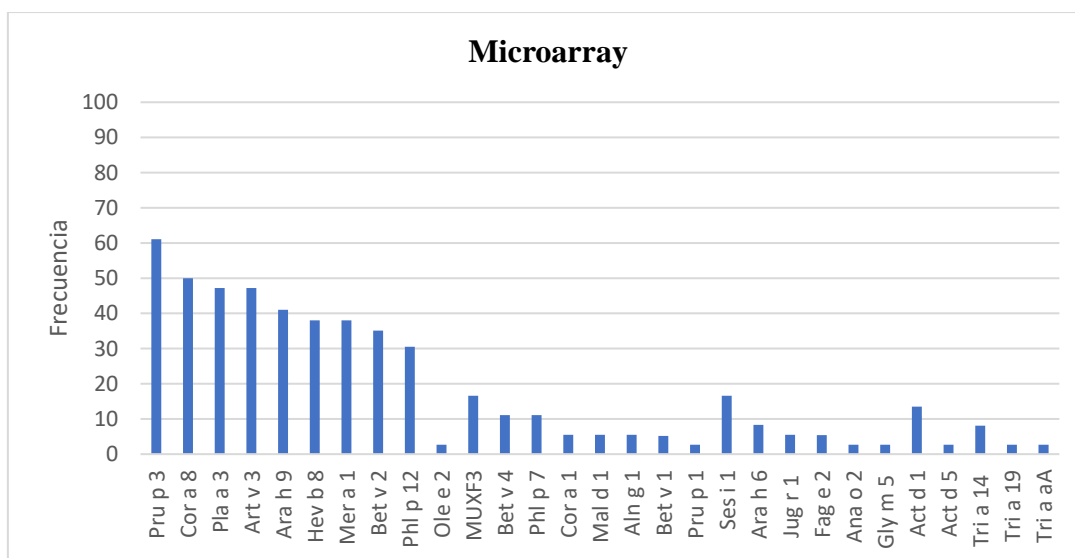
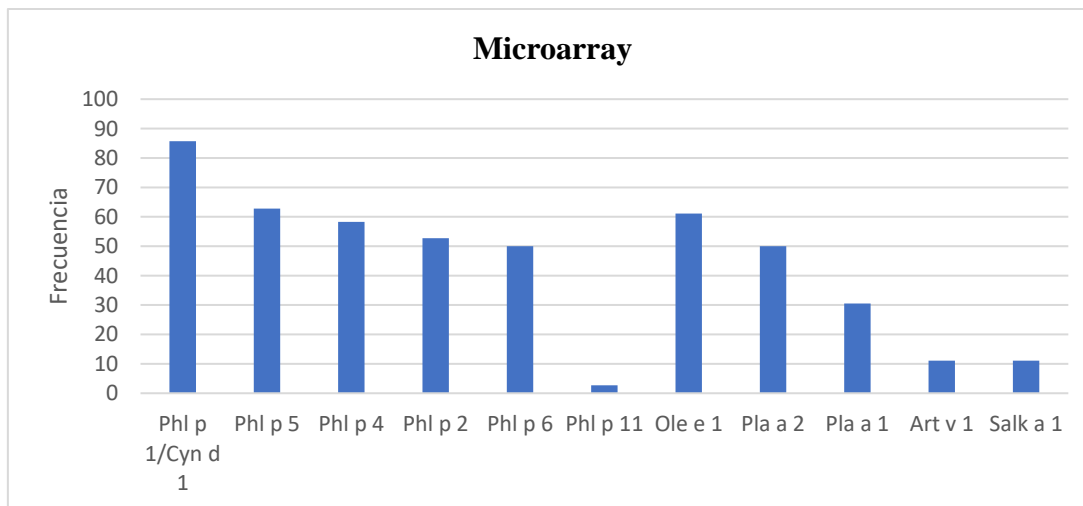


Figura 17. Frecuencia de sensibilización molecular mediante microarray.

RESULTADOS

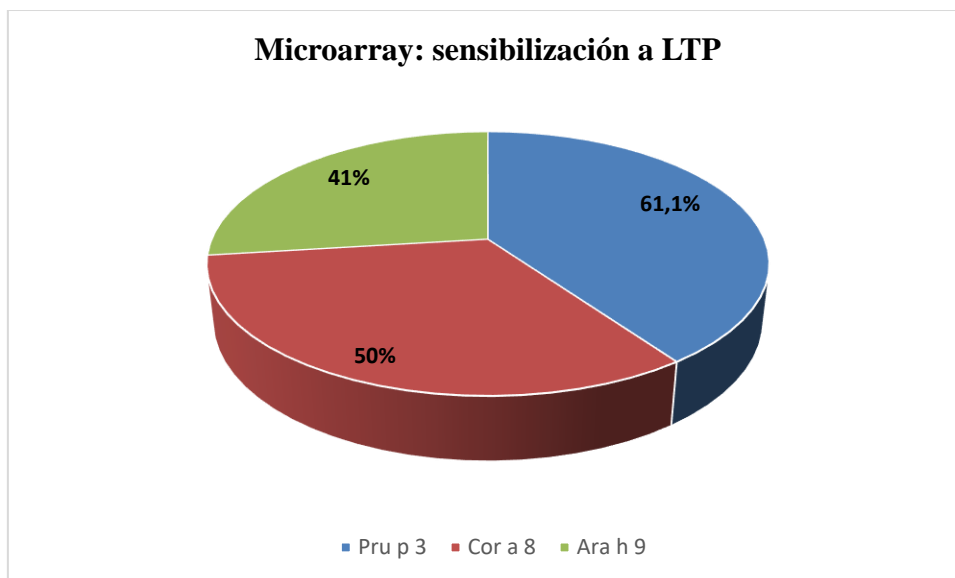


Figura 18. Frecuencia de pacientes sensibilizados a LTP mediante microarray.

4.1.4.C Estudio de correlaciones

En esta fase se incluyeron 49 pacientes pertenecientes al Hospital Fundación Jiménez Díaz. Se analizó la correlación existente entre la sensibilización a frutos secos mediante la determinación de los niveles de IgE específica a través de dos técnicas de diagnóstico molecular: ImmunoCAP e ISAC.

4.1.4.C.1 Correlación de niveles de IgE específica determinados mediante ImmunoCAP

Se analizó la sensibilización entre los extractos completos de frutos secos, así como de distintas nsLTPs disponibles comercialmente.

4.1.4.C.1.A Correlación entre extractos completos

Se analizó la correlación entre los niveles de IgE específica para los extractos completos de cacahuete, avellana, almendra, castaña, pistacho, piñón, anacardo, semillas de girasol y nuez (Tabla 16).

La correlación más alta se objetivó para dos frutos secos pertenecientes a la familia *Anacardiaceae*: pistacho y anacardo ($r= 0.95$, $p<0.001$) (Figura 19).

RESULTADOS

Se observaron correlaciones moderadas para avellana y cacahuete ($r=0.43$, $p:0.002$) (Figura 20), castaña y cacahuete ($r=0.57$, $p<0.001$), castaña y avellana ($r=0.58$, $p<0.001$), piñón y cacahuete ($r=0.51$, $p<0.001$), piñón y avellana ($r=0.42$, $p:0.004$) (Figura 21), piñón y almendra ($r=0.52$, $p<0.001$) así como para nuez y pistacho ($r=0.46$, $p=0.001$).

La correlación fue débil para otros frutos secos como la detectada entre pistacho y cacahuete ($r=0.25$, $p=0.085$), pistacho y almendra ($r=0.26$, $p=0.067$), pistacho y castaña ($r=0.25$, $p=0.139$), piñón y pistacho ($r=0.27$, $p=0.075$), semilla de girasol y cacahuete ($r=0.25$, $p=0.041$), semilla de girasol y pistacho ($r=-0.23$, $p=0.459$), semilla de girasol y anacardo ($r=-0.254$, $p=0.085$), nuez y piñón ($r=0.36$, $p=0.019$) así como para nuez y anacardo ($r=0.33$, $p=0.025$)

Sin embargo, la correlación fue muy débil o prácticamente nula entre pistacho y avellana ($r=0.15$, $p=0.304$), anacardo y cacahuete ($r=0.13$, $p=0.375$), anacardo y avellana ($r=0.03$, $p=0.852$), anacardo y almendra ($r=0.12$, $p=0.436$), anacardo y castaña ($r=0.01$, $p=0.931$) así como para anacardo y piñón ($r=0.08$, $p=0.617$).

	Cacahuete	Avellana	Almendra	Castaña	Pistacho	Piñón	Anacardo	Girasol	Nuez
Cacahuete		0.43	0.64	0.57	0.25	0.51	0.13	0.25	0.55
Avellana			0.69	0.58	0.15	0.42	0.03	0.86	0.75
Almendra				0.69	0.26	0.52	0.12	0.62	0.66
Castaña					0.22	0.78	0.01	0.9	0.67
Pistacho						0.27	0.95	-0.23	0.46
Piñón							0.08	0.76	0.36
Anacardo								-0.34	0.33
Girasol									0.88
Nuez									

Tabla 16. Correlación entre los niveles de IgE específica de los extractos completos de frutos secos determinados mediante ImmunoCAP.

RESULTADOS

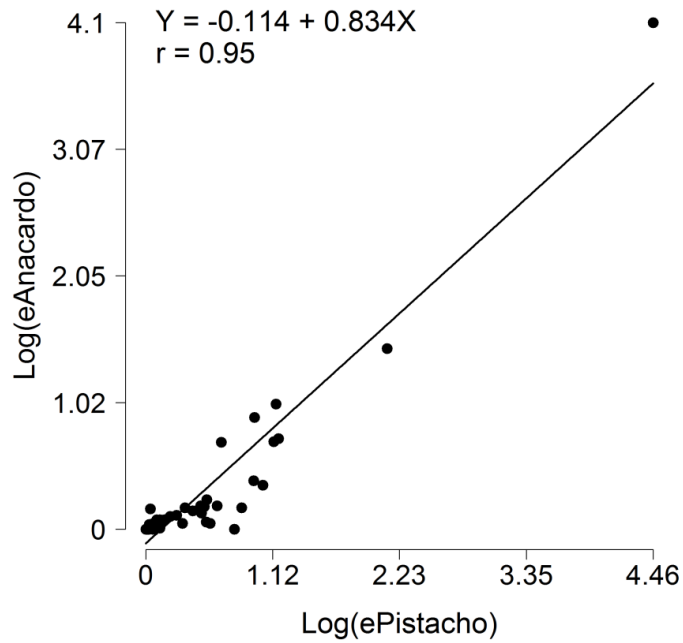


Figura 19. Correlación entre los niveles de IgE específica de anacardo y pistacho analizados mediante ImmunoCAP. r: coeficiente de regresión de Pearson

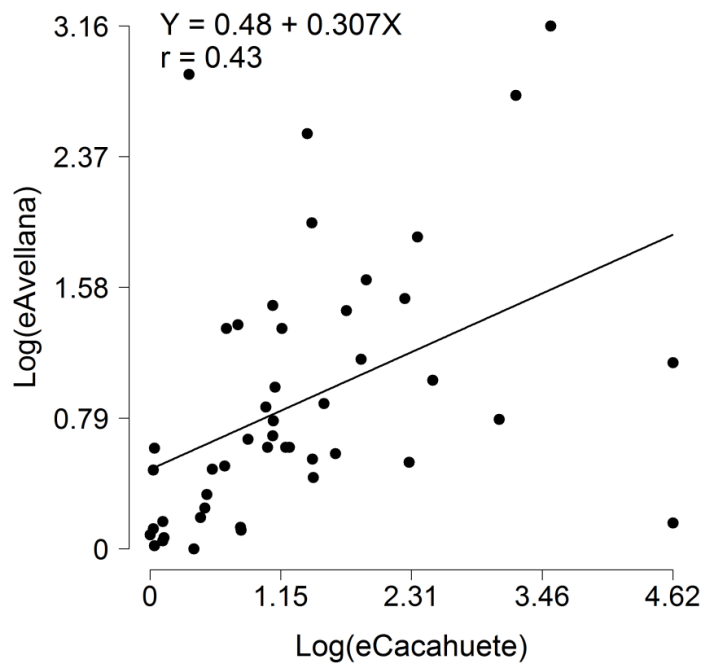


Figura 20. Correlación entre los niveles de IgE específica de avellana y cacahuete analizados mediante ImmunoCAP. r: coeficiente de regresión de Pearson

RESULTADOS

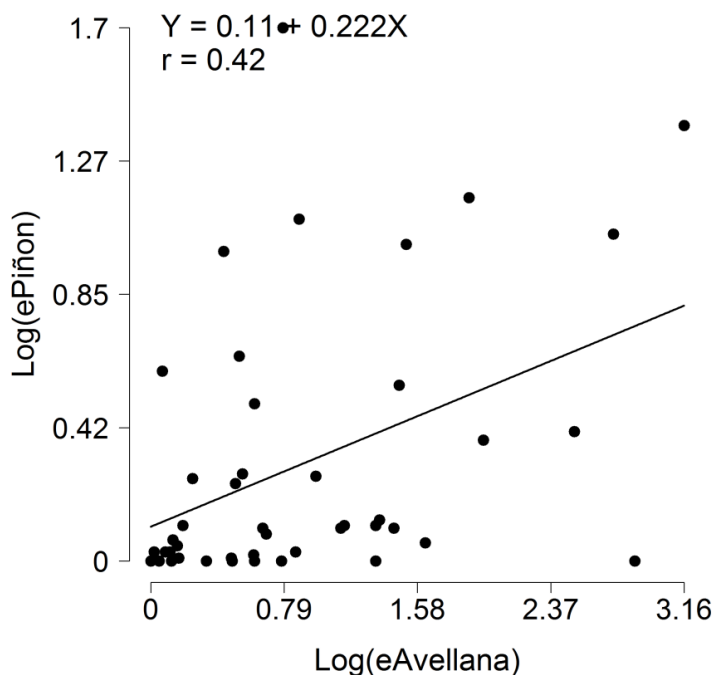


Figura 21. Correlación entre los niveles de IgE específica de avellana y piñón analizados mediante ImmunoCAP. r: coeficiente de regresión de Pearson

4.1.4.1.B Correlación entre nsLTPs

Se estudió la correlación entre distintas nsLTP (Art v 3, Ara h 9, Cor a 8, Pru p 3) objetivándose una correlación alta entre todas ellas siendo mayor la detectada entre Pru p 3 y Ara h 9 ($r = 0.95$, $p < 0.001$) (Tabla 17 y Figura 22).

	Art v 3	Ara h 9	Cor a 8	Pru p 3
Art v 3		0,82	0,71	0,79
Ara h 9			0,91	0,95
Cor a 8				0,89
Pru p 3				

Tabla 17. Correlación entre nsLTPs analizadas mediante ImmunoCAP. nsLTPs: Proteínas de transferencia de lípidos.

RESULTADOS

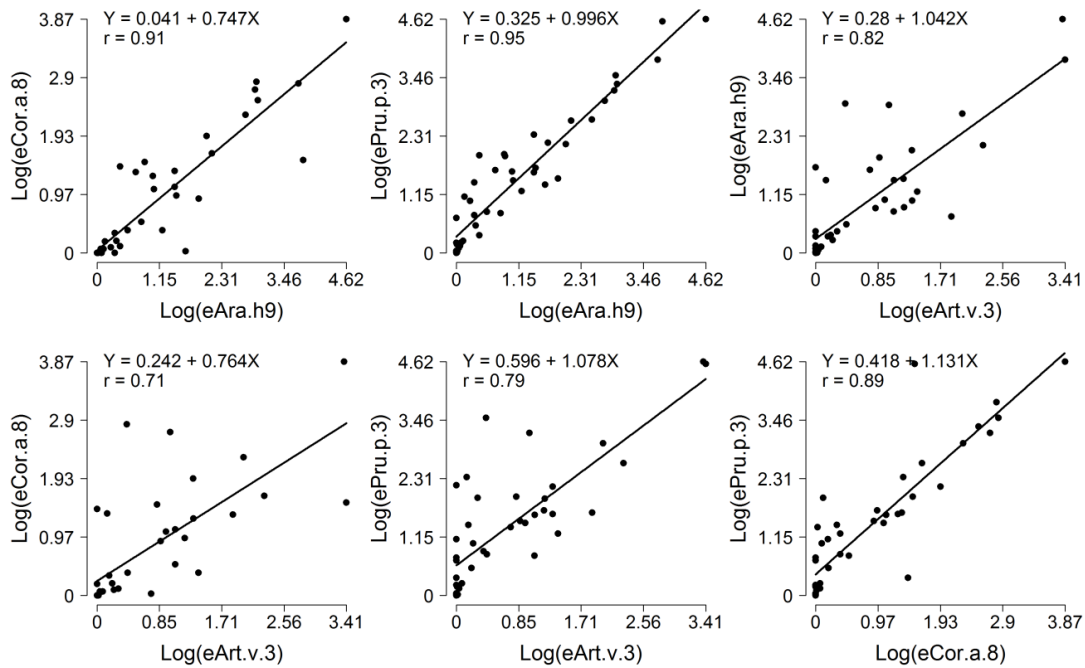


Figura 22. Representación gráfica de la correlación entre los niveles de IgE específica de las distintas nsLTPs analizadas mediante ImmunoCAP. nsLTPs: Proteínas de transferencia de lípidos. r : coeficiente de regresión de Pearson

4.1.4.1.C Correlación entre extractos completos vs nsLTPs

Se calculó la correlación entre los niveles de IgE específica de los extractos completos de los distintos frutos secos (cacahuete, avellana, almendra, castaña, pistacho, piñón, anacardo, semilla de girasol y nuez) y de las nsLTPs (Art v 3, Ara h 9, Cor a 8, Pru p 3) (Tabla 18).

Las correlaciones más altas se objetivaron para semilla de girasol y Ara h 9 ($r = 0.88$, $p < 0.001$), semilla de girasol y Cor a 8 ($r = 0.85$, $p < 0.001$), nuez y Ara h 9 ($r = 0.82$, $p < 0.001$) así como para nuez y Cor a 8 ($r = 0.85$, $p < 0.001$).

Los resultados mostraron una correlación moderada para castaña y Art v 3 ($r = 0.47$, $p = 0.001$), débil para cacahuete y Ara h 9 ($r = 0.37$, $p = 0.009$), cacahuete y Cor a 8 ($r = 0.34$, $p < 0.022$), cacahuete y Pru p 3 ($r = 0.34$, $p = 0.017$), pistacho-Art v 3 ($r = 0.35$, $p = 0.020$), piñón y Ara h 9 ($r = 0.28$, $p = 0.061$), piñón y Cor a 8 ($r = 0.24$, $p = 0.123$), piñón y Pru o 3 ($r = 0.24$, $p = 0.012$), anacardo y Art v 3 ($r = 0.32$, $p = 0.040$).

RESULTADOS

Sin embargo, la correlación fue muy débil o prácticamente nula para cacahuete y Art v 3 ($r= 0.18$, $p=0.242$), pistacho y Ara h 9 ($r= 0.14$, $p=0.343$), pistacho y Cor a 8 ($r= 0.10$, $p=0.512$), pistacho y Pru p 3 ($r= 0.04$, $p=0.759$), anacardo y Ara h 9 ($r= 0.03$, $p=0.860$), anacardo y Cor a 8 ($r= 0.01$, $p=0.924$), y Pru p 3 ($r= -0.04$, $p=0.782$) así como para piñón y Art v 3 ($r= 0.16$, $p=0.331$).

	Cacahuete	Avellana	Almendra	Castaña	Pistacho	Piñón	Anacardo	Girasol	Nuez
Art v 3	0.18	0.54	0.64	0.47	0.35	0.16	0.32	0.65	0.61
Ara h 9	0.37	0.70	0.70	0.61	0.14	0.28	0.03	0.88	0.82
Cor a 8	0.34	0.75	0.62	0.55	0.10	0.24	0.01	0.85	0.85
Pru p 3	0.34	0.69	0.70	0.60	0.04	0.24	-0.04	0.79	0.80

Tabla 18. Correlación entre los niveles de IgE específica entre extractos completos y distintas nsLTPs analizados mediante ImmunoCAP. nsLTPs: Proteínas de transferencia de lípidos

4.1.4.C.2 Correlación de niveles de IgE específica determinados mediante microarray

Se estudió la correlación entre diferentes nsLTPs (Art v 3, Pru p 3, Ara h 9, Jug r 3, Tri a 14) disponibles comercialmente mediante esta técnica (Tabla 19). Los resultados obtenidos indicaron una correlación elevada para todas ellas y moderada para Tri a 14 y Pru p 3 ($r= 0.47$, $p=0.004$), Tri a 14 y Cor a 8 ($r= 0.56$, $p<0.001$) así como para Tri a 14 y Jug r 3 ($r= 0.52$, $p<0.001$). No se objetivaron niveles de correlación débiles ni prácticamente nulos.

	Art v 3	Pru p 3	Cor a 8	Ara h 9	Jug r 3	Tri a 14
Art v 3		0.77	0.78	0.77	0.63	0.66
Pru p 3			0.72	0.70	0.74	0.47
Cor a 8				0.69	0.61	0.56
Ara h 9					0.80	0.71
Jug r 3						0.52
Tri a 14						

Tabla 19. Correlación entre los niveles de IgE específica de distintas nsLTPs pertenecientes a frutos secos y a maíz analizados mediante microarray. nsLTPs: Proteínas de transferencia de lípidos.

4.2 FASE II: Búsqueda de patrones geográficos diferenciales en alergia a frutos secos en España

4.2.1 Pacientes

Para comparar las diferencias regionales de la alergia a frutos secos, se estudiaron dos poblaciones, la de Madrid procedente del Servicio de Alergia del Hospital Fundación Jiménez Díaz y otra procedente del Hospital Universitario Central de Asturias. En total se incluyeron un total de 77 pacientes, 49 de Madrid y 28 de Asturias.

4.2.1.A Sexo y edad

Los pacientes de Madrid presentaron una edad media de 30 años: 46,9% mujeres (23 de los 49 pacientes) y 53,1% varones (26 de los 49 pacientes). La edad media en Asturias fue de 33,4 años: 42,9% mujeres (12 de los 28 pacientes) y 57,1% hombres (16 de los 28 pacientes). 15 pacientes menores de 18 años participaron en el estudio (8 en Madrid y 7 en Asturias). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre estos parámetros al comparar ambas poblaciones ($p > 0.05$) (Tabla 20).

Características	Madrid	Asturias
Número de pacientes	49	28
Edad (media \pm DS)	30,1 \pm 13,5	33,4 \pm 17,4
Sexo	46,9% mujeres/53,1% varones	42,9% mujeres/57,1% varones

Tabla 20. Características de los pacientes con alergia a frutos secos de Madrid y Asturias. DS: desviación estandar.

4.2.2 Cuestionario clínico-epidemiológico

4.2.2.A Alergia respiratoria

Síntomas oculo-nasales y/o asma bronquial

El 81,6% de los pacientes de Madrid y el 56,6% de los pacientes de Asturias presentaron alergia respiratoria. Todos los pacientes de Madrid asociaban asma mientras que, en Asturias, la rinitis fue el síntoma más prevalente (47% rinitis, 29% rinitis y asma, y el 23,5% asma).

RESULTADOS

4.2.2.B Síntomas con frutos secos, así como con otros alimentos vegetales

4.2.2.B.1 Frutos secos

Una vez realizado el diagnóstico definitivo, los frutos secos más frecuentemente implicados en producir síntomas de alergia en ambas regiones fueron la avellana, la nuez y el cacahuete. En Madrid el más frecuente fue la nuez (32 pacientes-65,3%) seguido de la avellana (28 pacientes-57,1%), cacahuete (23 pacientes-46,9%) y la almendra (21 pacientes-42%) mientras que en Asturias el más frecuente fue la avellana (16 pacientes-57,1%), seguido de la nuez (14 pacientes-50%), cacahuete (13 pacientes-46,4%) y almendra (3 pacientes-10,7%). En menor frecuencia fueron otros frutos secos los implicados (Figura 23).

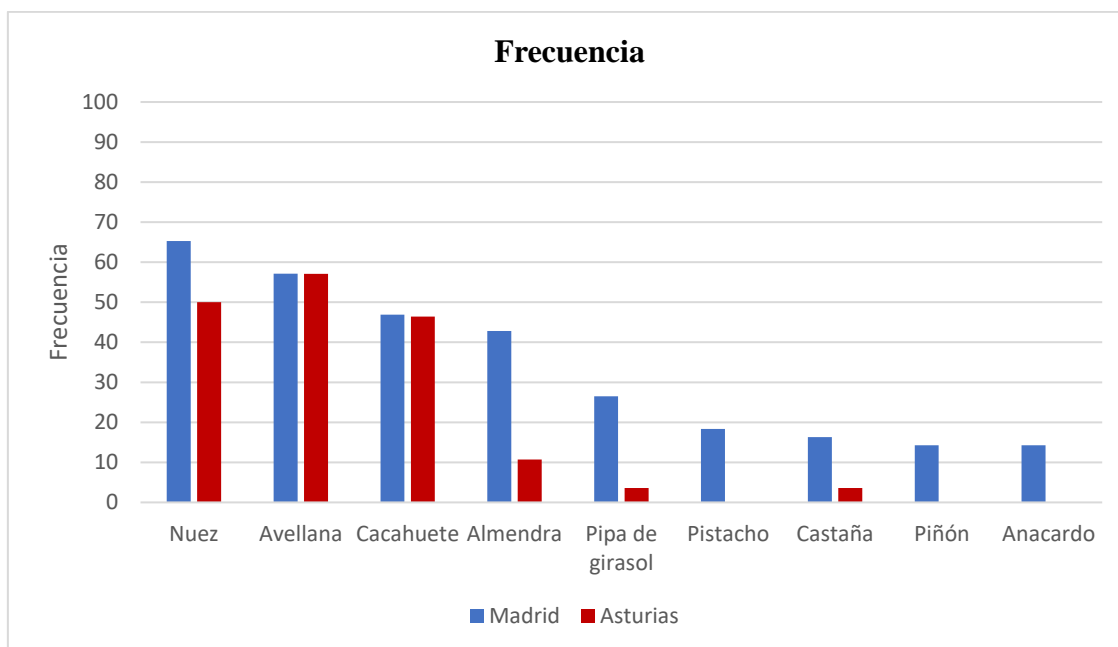


Figura 23. Frecuencia de pacientes que presentaron síntomas tras el diagnóstico definitivo en Madrid y Asturias.

En Madrid un 73,3% de los pacientes presentaron síntomas sistémicos (SS) tras la ingesta (36 de los 49 pacientes) y un 26,5% (13 de los 49 pacientes) síntomas localizados en la cavidad oral (SAO). En Asturias, el mismo número (14 de los 28 pacientes-50%) presentó síntomas sistémicos y SAO ($p<0.05$).

RESULTADOS

En ambas regiones, la nuez fue el fruto seco que con mayor frecuencia produjo síntomas sistémicos (22 pacientes en Madrid y 7 pacientes en Asturias), mientras que los síntomas localizados en la cavidad oral fueron producidos por la nuez en mayor número de pacientes en Madrid (10 pacientes) y por la avellana en Asturias (10 pacientes) (Tabla 21).

Síntomas	MADRID		ASTURIAS	
	n	%	n	%
Avellana	28		16	
SAO	9	32,1	10	62,5
SS	19	67,9	6	37,5
Cacahuete	23		13	
SAO	5	21,7	8	61,5
SS	18	78,3	5	38,5
Nuez	32		14	
SAO	10	31,2	7	50
SS	22	68,8	7	50

Tabla 21. Frecuencia de pacientes que presentaron síntomas con los frutos secos más frecuentemente implicados. SAO: síndrome de alergia oral. SS: síntomas sistémicos. n: número de pacientes.

4.2.2.B. 2 Otros alimentos vegetales

Un 81,6 % y un 50% de los pacientes en Madrid y en Asturias respectivamente presentaron síntomas con otros alimentos de origen vegetal. Tanto en Asturias como en Madrid el melocotón fue el alimento más frecuente (28 pacientes-57,4% en Madrid y 11 pacientes-39,2% en Asturias) seguido del kiwi (16 pacientes-32,6% en Madrid y 3 pacientes-10,7% en Asturias), melón (16 pacientes-32,6% en Madrid y 1 paciente-3,5% en Asturias) (Figura 24).

RESULTADOS

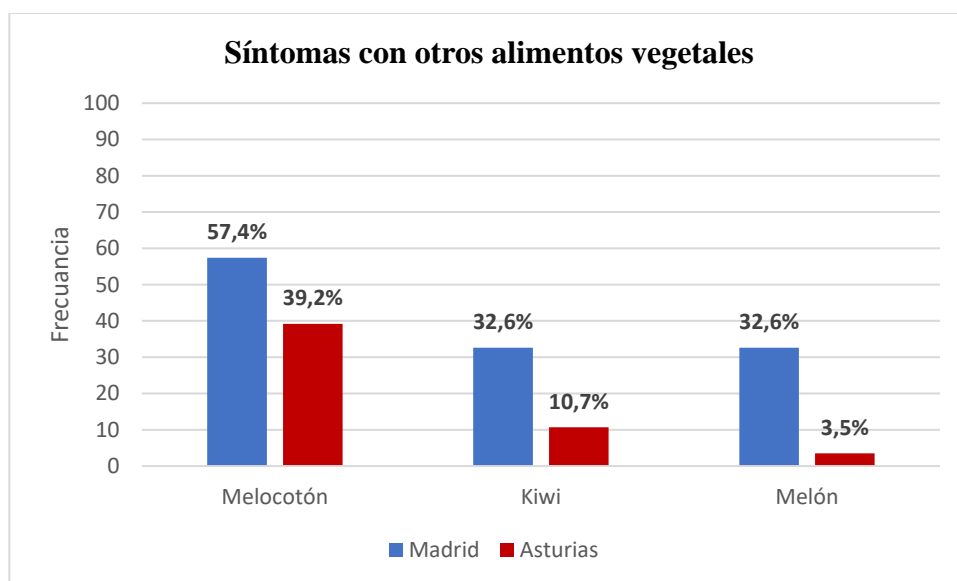


Figura 24. Frecuencia de pacientes que presentaron síntomas con otros alimentos de origen vegetal en Madrid y Asturias.

4.2.2.C Edad de comienzo de síntomas de la alergia a frutos secos

En ambas regiones, la edad media de aparición de los síntomas fue similar (20,73 años en Madrid vs 19,5 años en Asturias); siendo en Madrid la edad de inicio más temprana 2 años y la más tardía 56 años y en Asturias 5 años y 77 años respectivamente.

4.2.2.D Tiempo de latencia entre la ingesta del alimento y la aparición de los síntomas

En ambas regiones, la mayoría de los pacientes presentaron la reacción alérgica tras la ingesta de frutos secos en < 5 minutos (Madrid 46,9%, Asturias 84,1%). En Madrid un 36,7% entre 5-30 minutos seguido de un 10,2% en >60 minutos y un 6,2% entre 30-60 minutos. En Asturias un 10,7% de los pacientes presentaron síntomas entre 30-60 minutos y >60 minutos y un 7,1% entre 5-30 minutos (Figura 25).

RESULTADOS

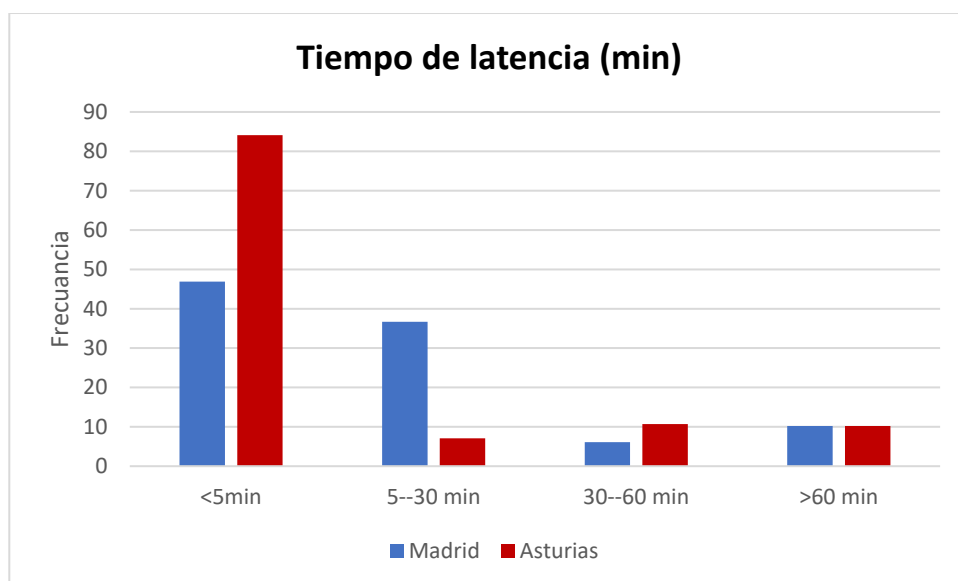


Figura 25. Frecuencia de pacientes que presentaron síntomas en diferentes tiempos de latencia tras la ingestión de frutos secos en Madrid y Asturias.

4.2.2.E Requerimiento de tratamiento ambulatorio

En Madrid 25 pacientes (51%) precisaron tratamiento mientras que en Asturias lo requirieron un 35,8% (10 pacientes) (Figura 26).

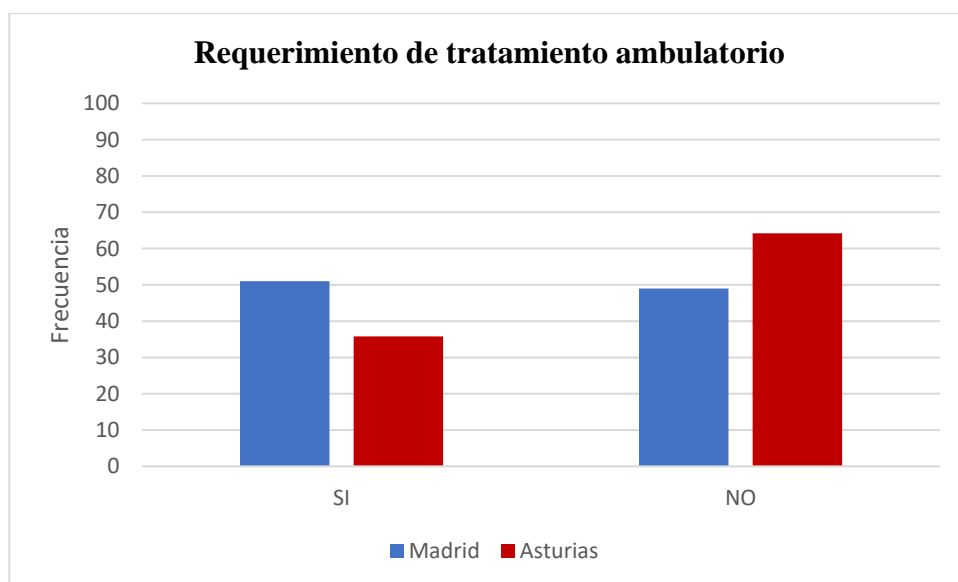


Figura 26. Frecuencia de pacientes que precisaron tratamiento durante la reacción alérgica en Madrid y Asturias.

RESULTADOS

4.2.2.F En el caso de que fueran los frutos secos los implicados, especificar la mínima cantidad con la que presentó reacción

En ambas regiones, lo más frecuente fue presentar una reacción alérgica con 2 a 5 piezas (32,6%-Madrid y 28,6%-Asturias) seguido de una pieza (30,6%-Madrid y 24,5%-Asturias). En Madrid le siguió en frecuencia 5 a 10 piezas (14,2%) y en Asturias como alimento oculto (14,3%). En Madrid presentaron síntomas con el alimento oculto un 12,2% y sólo en esta región un 10,2% reportaron síntomas con más de 10 piezas (Figura 27).

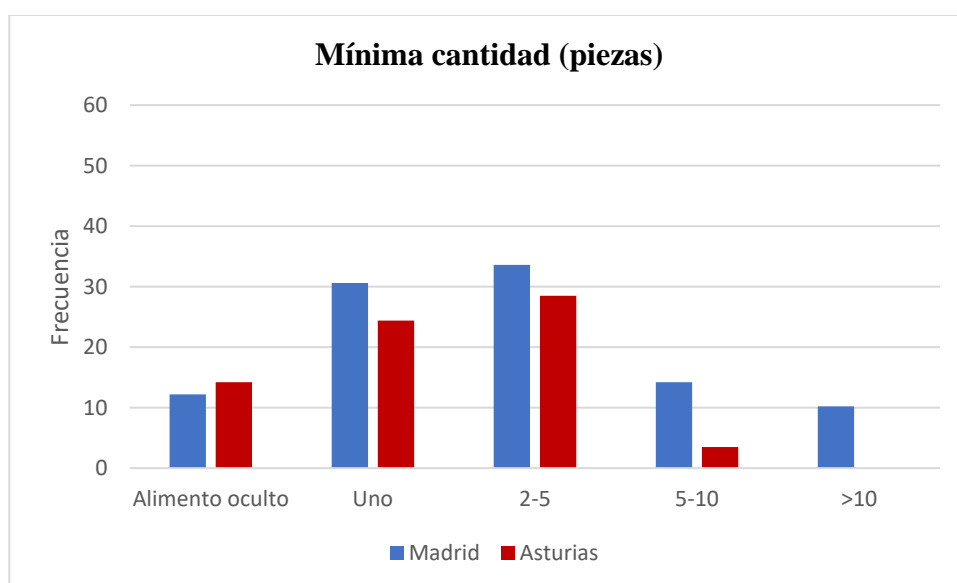


Figura 27. Frecuencia de pacientes que presentaron síntomas con la mínima cantidad de frutos secos en Madrid y Asturias.

4.2.3 Pruebas cutáneas

4.2.3.A Pruebas cutáneas con pólenes

Véase Figura 28.

4.2.3.A.1 Pólenes de gramíneas y abedul

En Madrid, 77,5% de los pacientes estaban sensibilizados a pólenes de gramíneas y un 47% a polen de abedul mientras que un 44,5% estaban sensibilizados a ambos pólenes.

RESULTADOS

En Asturias, 57,1% estaban sensibilizados a pólenes de gramíneas, un 42,8% a polen de abedul y sólo un 3,6% estaban sensibilizados a ambos pólenes.

4.2.3.A.2 Pólenes de Arizónica, plátano de sombra y olivo

En Madrid, el 80,4% de los pacientes estaban sensibilizados a polen de arizónica, seguido de plátano de sombra (70%) y olivo (69,5%) mientras que en Asturias la sensibilización a polen de olivo fue del 42,8% seguido de plátano de sombra (17,8%) y por último de arizónica (3,5%).

4.2.3.A.3 Pólenes de malezas

Madrid es la región donde mayor sensibilización a pólenes de malezas se detectó siendo por orden de frecuencia el plantago (82,6%), salsola (58,6%), parietaria (56,2%) y artemisia (48,9%) mientras que en Asturias el 42,8% de pacientes estaban sensibilizados a plantago y artemisia, salsola (10,7%) y parietaria (3,5%).

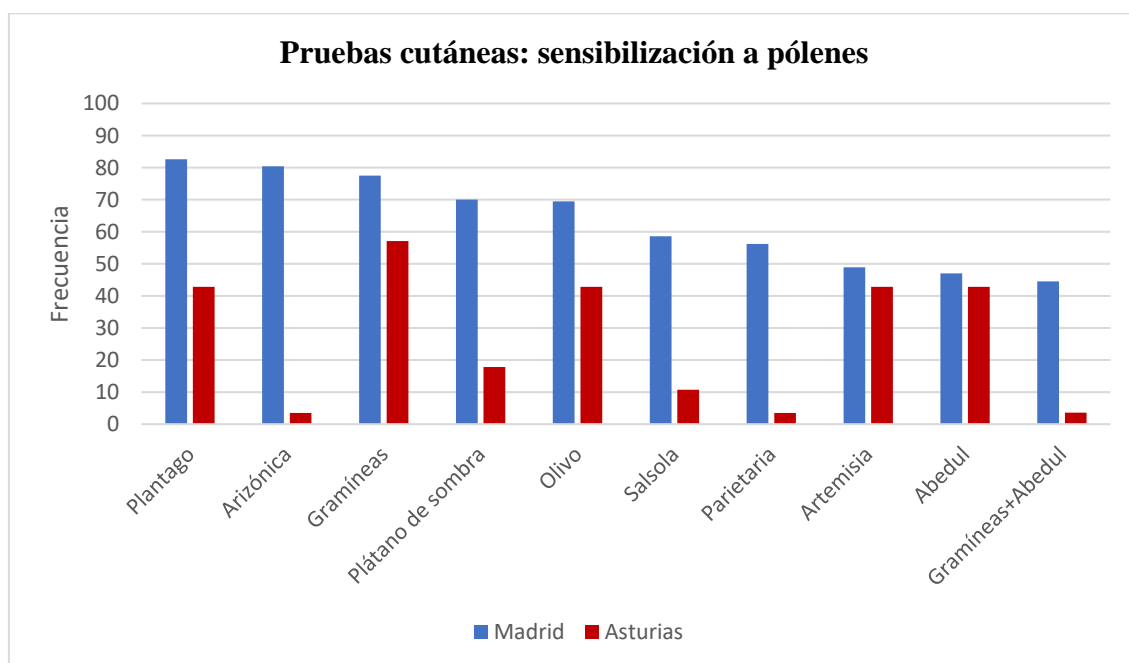


Figura 28. Frecuencia de sensibilización a pólenes en pacientes con alergia a frutos secos en Madrid y Asturias.

4.2.3.B Pruebas cutáneas con LTP y profilina

En Madrid 37 pacientes (75,5%) estaban sensibilizados a LTP, 17 pacientes (34,6%) a profilina y 14 pacientes (28,6%) estaban sensibilizados a ambas. En Asturias 12 pacientes

RESULTADOS

(42,8%) presentaban sensibilización a LTP, 24 pacientes (14,2%) a profilina y 1 paciente (3,5%) estaba sensibilizado a ambas (Figura 29).

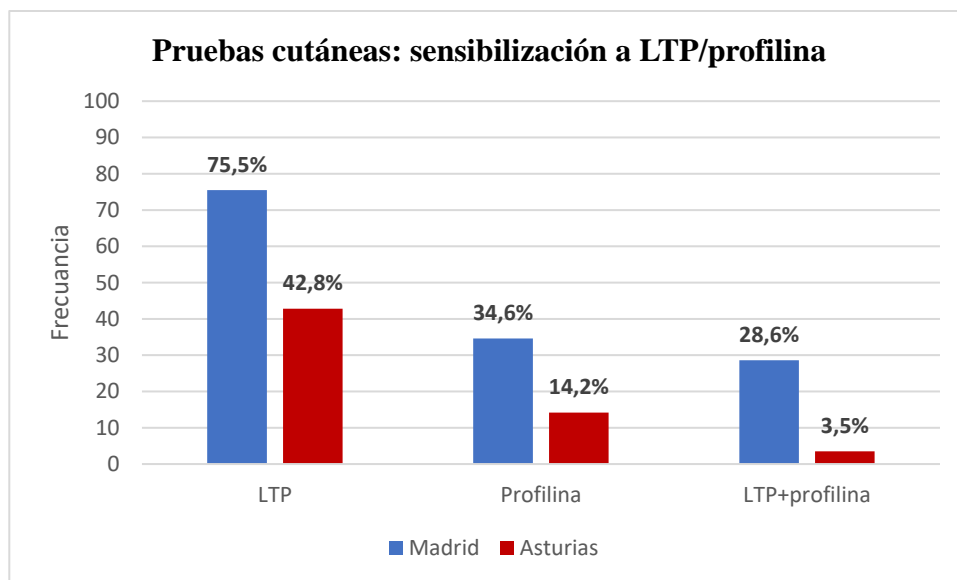


Figura 29. Frecuencia de sensibilización a LTP y/o profilina en pacientes con alergia a frutos secos en Madrid y Asturias.

4.2.3.C Pruebas cutáneas con alimentos

4.2.3.C.1 Pruebas cutáneas con frutos secos

4.2.3.C.1.A Extractos comerciales

El fruto seco al que estaba sensibilizado un mayor número de pacientes de Madrid fue el pistacho (77,5%) mientras que en Asturias fue la castaña (60,7%). Le siguieron en orden de frecuencia de sensibilización: Madrid: cacahuete y piñón (69,3%), avellana (68,2%) castaña (65,3%), nuez (61,2%), semilla de girasol y almendra (53%); Asturias: cacahuete (53,5%), nuez (50%), avellana (42,8%), pistacho (35,7%), almendra (32,1%), semilla de girasol (28,5%) y anacardo (10,7%) (Figura 30).

RESULTADOS

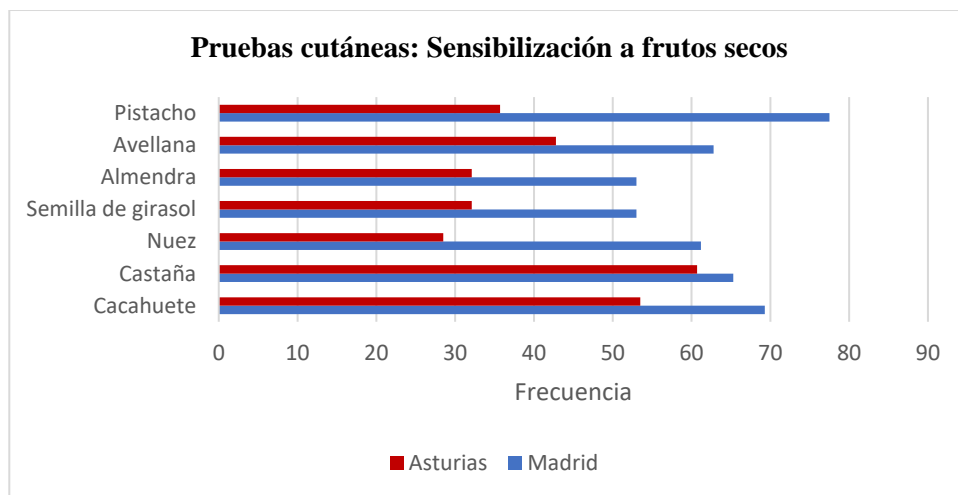


Figura 30. Frecuencia de sensibilización a frutos secos mediante prueba cutánea (extracto comercial) en Madrid y Asturias.

Del total de los pacientes diagnosticados de cada uno de los frutos secos en Madrid, todos ellos presentaron prueba cutánea positiva para semilla de girasol, 86,9% para cacahuete, 78% para nuez, 64,2% para avellana y 57,14% para almendra. En Asturias todos ellos presentaron pruebas positivas para semilla de girasol y almendra, el 92,3% para cacahuete, el 53,8% para nuez y el 53,3% para avellana (Figura 31).

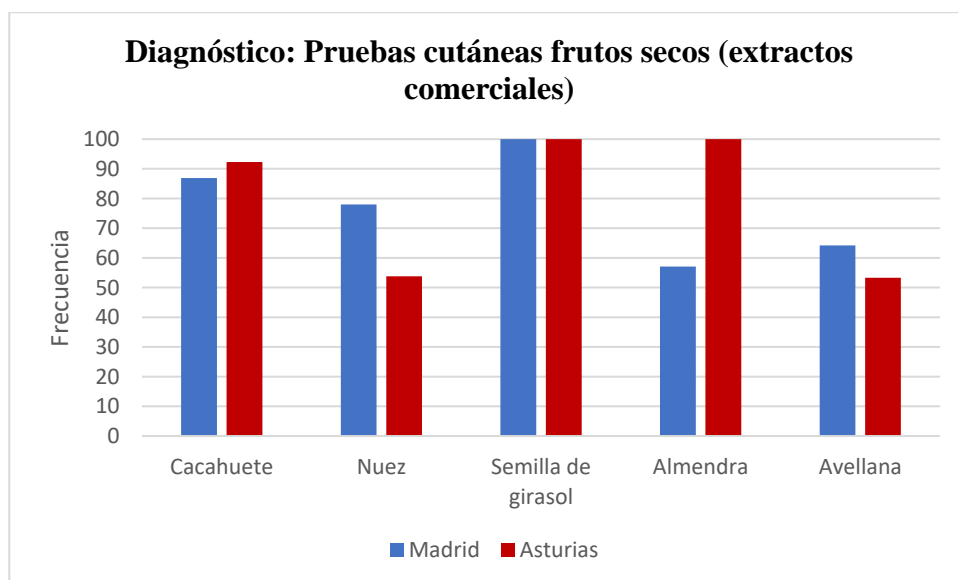


Figura 31. Frecuencia de pacientes sensibilizados a frutos secos mediante prueba cutánea (extracto comercial) tras el diagnóstico en Madrid y Asturias.

RESULTADOS

4.2.3.C.2 Pruebas cutáneas con frutas

En Madrid la fruta a la que mayor número de pacientes estaban sensibilizados fue el melocotón (75%) seguido del kiwi (51%), melón (46,9%), manzana (22,4%) y plátano (8,1%) mientras que en Asturias lo fue el melón (28,5%) seguido del kiwi (21,4%), melocotón, plátano y manzana (10,7%) (Figura 32).

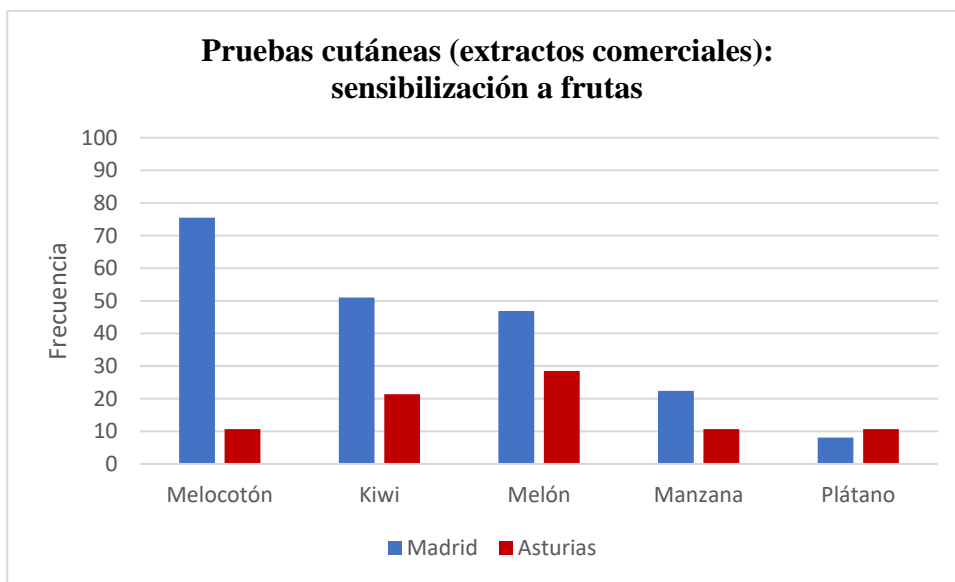


Figura 32. Frecuencia de sensibilización a frutas mediante pruebas cutáneas (extracto comercial) en Madrid y Asturias.

4.2.4 Determinación de IgE específica mediante ImmunoCAP

Véase Anexo3.

4.2.4.A Patrón de sensibilización molecular en Madrid y Asturias

En ambas regiones se objetivaron diferentes patrones de sensibilización molecular. (Figura 33 y tabla 22).

En Madrid, la sensibilización a Pru p 3 fue 71,4% seguida de Ara h 9 (61,2%), Cor a 8 (44,9%), Phl p 12 (20,4%), y Bet v 1 (12%). En Asturias, el 46,4% de los pacientes estaban sensibilizados a Pru p 3, 42,9%, Bet v 1, 33,3%, Ara h 9, 30%, Cor a 8 y un 14,3% a Phl p 12.

RESULTADOS

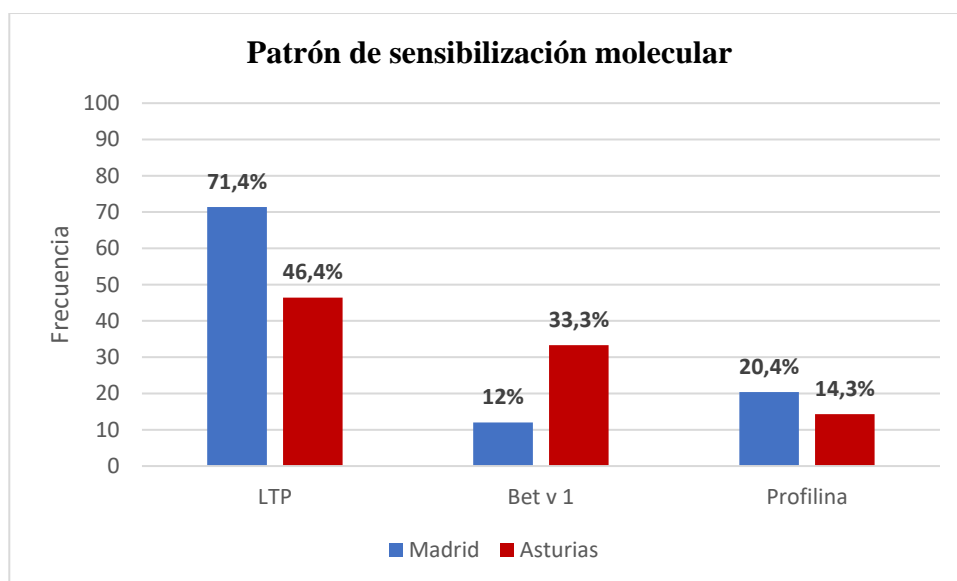


Figura 33. Diferencias en los niveles de IgE específica con alérgenos purificados en Madrid y Asturias.

Alérgeno	Asturias	Madrid	<i>p</i>
Pru p 3	0.23 (0.04,3.11)	2.40 (0.23,7.58)	0.037
Phl p 12	0.03 (0.00, 0.06)	0.05(0.01,0.32)	0.205
Bet v 1	0.06 (0.00, 4.05)	0.01 (0.00,0.04)	0.005

Tabla 22. Diferencias en los niveles de IgE específica con alérgenos purificados en Madrid y Asturias (mediana, Q1 y Q3).

En Madrid, el porcentaje de sensibilización a LTP era mayor que la sensibilización a Bet v1 (LTP- 71,4%; Phl p 12-20,4% ; Bet v 1-12%; $p < 0.05$). Este patrón molecular de sensibilización se objetivó en los frutos secos más prevalentes: nuez (78,0% LTP vs. 18,7%-Phl p 12 vs. 12,5%- Bet v 1), avellana (78,6%- LTP vs. 18%-Phl p 12 vs. 12,0% Bet v 1), y cacahuete (78,6%- LTP vs. 13%-Phl p 12 vs. 8,7%- Bet v 1). Sin embargo, el patrón molecular de sensibilización en Asturias fue muy diferente; en los pacientes con alergia a avellana fue Bet v 1 el alérgeno implicado (56,2%- Bet v 1 vs. 31,2% LTP vs. 6,7%-Phl p 12) mientras que la LTP fue el alérgeno predominante en los pacientes alérgicos a cacahuete (61,5%-LTP vs. 30,8%-Bet v 1 vs. 7%-Phl p 12) y a nuez (42,9%- LTP vs.42,9%- Bet v 1 vs. 15,4%-Phl p 12) (Figura 34).

RESULTADOS

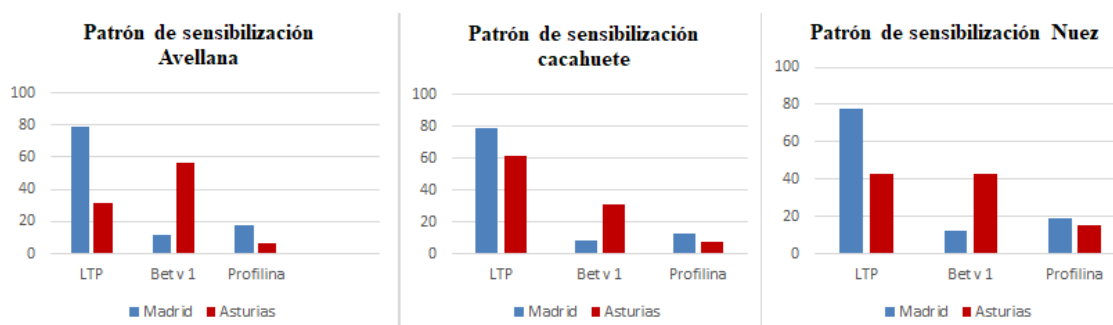


Figura 34. Diferencias en el patrón de sensibilización en pacientes con alergia a los frutos secos más prevalentes en Madrid y Asturias.

4.2.4.B Frecuencia de sensibilización según patrón molecular

En Asturias y con respecto a la frecuencia de alergia a frutos secos en los pacientes sensibilizados a LTP, el cacahuete fue el fruto seco más frecuentemente implicado en producir reacciones alérgicas (61,5%) seguido de la nuez (46,1%) y avellana (38,5%). Sin embargo entre los pacientes sensibilizados a Bet v 1, lo fue la avellana (75%) seguido de la nuez (50%) y el cacahuete (33%) (Figura 35).

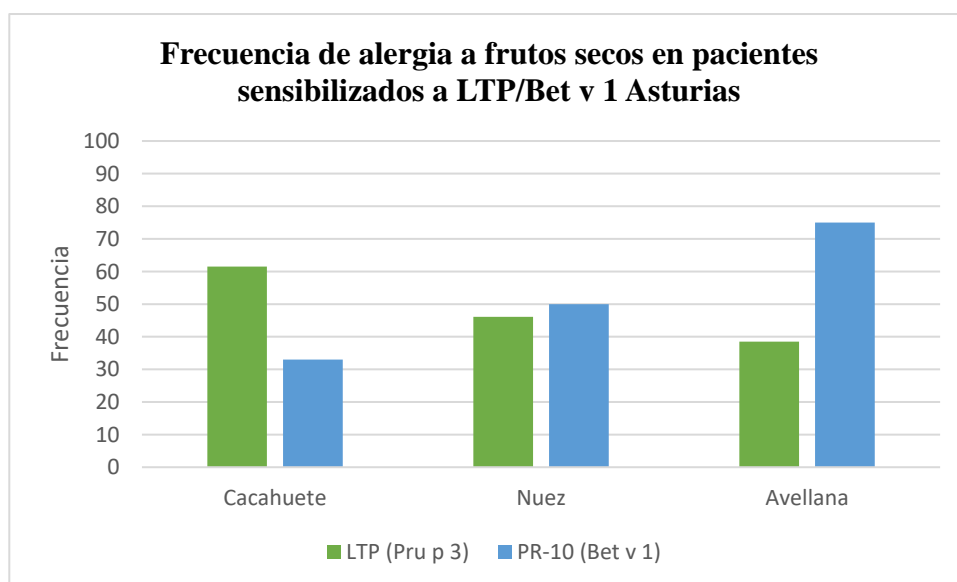


Figura 35. Frecuencia de alergia a frutos secos en pacientes sensibilizados a LTP/Bet v 1 en Asturias.

4.3 FASE III: Búsqueda de nuevos patrones de alergia a frutos secos: Síndrome pistacho-anacardo

4.3.1 Pacientes

Se incluyeron un total de 6 pacientes pertenecientes al Hospital Fundación Jiménez Díaz de Madrid.

4.3.1.A Edad y sexo

La media de edad de los pacientes fue $9,3 \pm 6,8$ años (rango 2-20 años) con un predominio de los hombres (67%) respecto a las mujeres (33%) (Tabla 23).

Número de pacientes	6
Edad (media\pmDS)	$9,3 \pm 6,8$
Sexo	33% mujeres/67% varones

Tabla 23. Características de los pacientes con alergia a pistacho y anacardo

.DS: desviación estándar.

4.3.2 Características clínicas

4.3.2.A Alergia respiratoria

Sólo 1 paciente (16,6%) presentó síntomas de polinosis.

4.3.2.B Síntomas con pistacho y/o anacardo, así como con otros alimentos

Todos los pacientes presentaron síntomas sistémicos tras la ingestión de pistacho y anacardo siendo la anafilaxia el síntoma más frecuente (3 pacientes-50%). El anacardo fue el más frecuentemente implicado afectando al 83,3% de los pacientes. El 83,3% de los pacientes no presentaron alergia a otros alimentos

4.3.3 Pruebas cutáneas con pistacho y anacardo

Todos los pacientes presentaron pruebas cutáneas positivas para ambos frutos secos: pistacho y anacardo.

RESULTADOS

4.3.4 Determinación de IgE específica (ImmunoCAP)

Todos los pacientes presentaron IgE específica $\geq 0,35$ kU/L para pistacho y anacardo con resultado negativo para la albúmina 2S del cacahuete (Ara h 2) excepto 1 paciente que presentó niveles superiores a 0,1 kU/L (Tabla 24).

IgE específica (kU/L)	Anacardo	Pistacho	Ara h 2
1	0,63	0,62	0
2	2,84	2,52	NR
3	2,64	8,3	0
4	1,79	2,15	0,04
5	0,2	0,23	0
6	1,31	0,03	0,06

*NR: No realizado

Tabla 24. Niveles de IgE específica para en pacientes con alergia a pistacho y anacardo.

4.3.5 Detección de proteínas IgE reactivas en extractos de pistacho y anacardo

Todos los pacientes presentaron IgE específica para pistacho y anacardo excepto un paciente que presentó IgE específica $<0,1$ kU/L para pistacho, pero con pruebas cutáneas positivas para ambos frutos secos.

En la detección de bandas IgE los sueros de los pacientes presentaron un patrón de reconocimiento proteico similar en los extractos de pistacho y anacardo en condiciones no reductoras (Figura 36). La mayoría de las albúminas 2S presentaron un tamaño de 13-17 kDa. En nuestro estudio, 5 de los 6 pacientes (83%) que presentaron síntomas sistémicos reconocieron bandas de 14 kDa aproximadamente en los extractos de pistacho y anacardo.

RESULTADOS

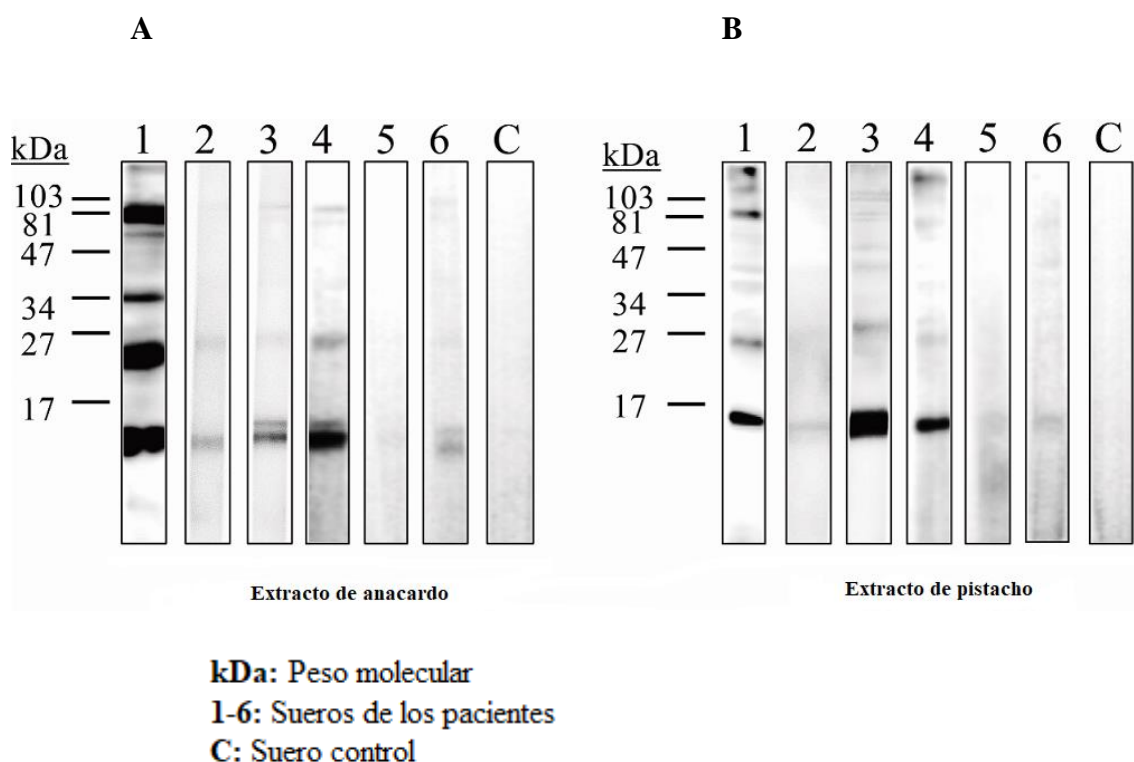


Figura 36. Immunoblotting con extracto de anacardo (A) y pistacho (B) en pacientes con alergia a pistacho y anacardo.

4.3.6 Identificación y caracterización de albúminas 2S en extractos de pistacho y anacardo

Las proteínas IgE reactivas del anacardo y del pistacho fueron separadas utilizando una cromatografía de exclusión de tamaño Sephadex G-50 y RP-HPLC. Las proteínas eluídas correspondientes a aquellas reconocidas por las IgEs de los sueros de los pacientes se visualizaron mediante SDS-PAGE (Figura 37A). La identidad de las proteínas de masa molecular de 14 kDa fueron identificadas mediante la huella peptídica a través de las técnicas de espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF (Figura 37B). Los resultados obtenidos mediante espectrometría de masas se analizaron mediante el programa BLASTp siendo identificadas como albúminas 2S del anacardo (Ana o 3) y pistacho (Pis v 1) alcanzando un 44% y un 28% respectivamente del total de la secuencia de aminoácidos de la proteína (estructura primaria).

RESULTADOS

En condiciones reductoras con β -mercaptoetanol, las proteínas se fragmentaron en dos subunidades de 8 kDa y 4 kDa, unidas entre ellas mediante puentes disulfuro debido a la presencia de residuos de cisteína.

Las albúminas 2S purificadas del anacardo mostraron tres bandas en condiciones reductoras (Figura 37A); hecho que pudiera ser debido a la presencia de residuos proteicos no digeridos o isoformas de la subunidad de 8 kDa.

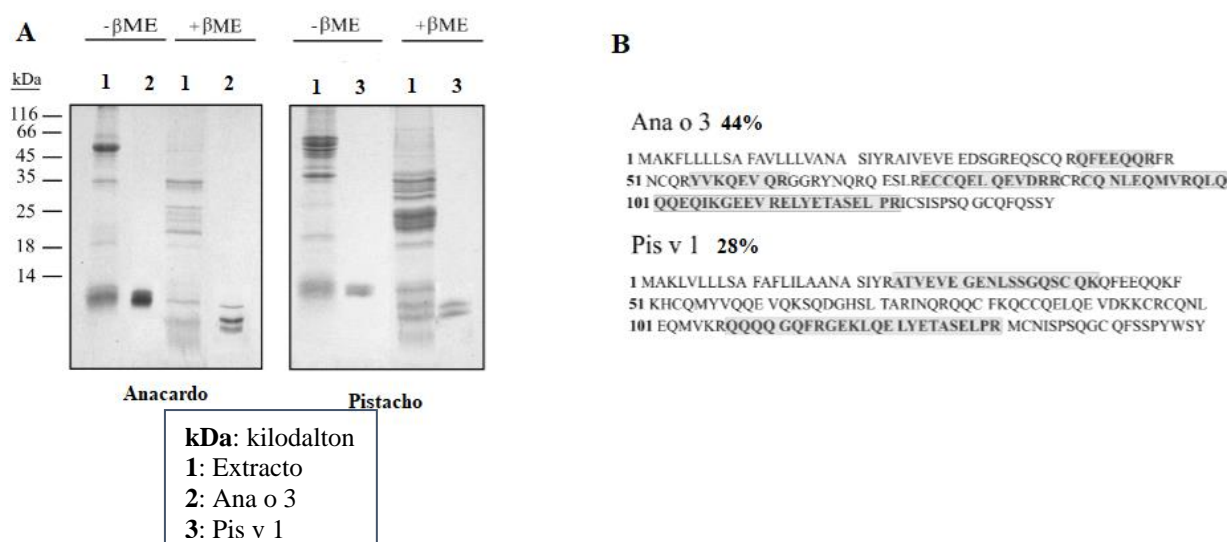


Figura 37. Caracterización estructural de Pis v 1 y Ana o 3 purificadas. (A). SDS-PAGE con tinción azul de Coomassie de extractos de frutos secos y albúminas 2S purificadas con/sin β -mercaptoetanol (β -ME). (B) Identificación mediante espectrometría de masas.

4.3.7 Capacidad de unión y reactividad cruzada de las proteínas IgE

La capacidad de unión de IgE de ambas albúminas 2S purificadas se demostró mediante ELISA e Immunoblotting en los seis pacientes estudiados. Todos ellos reconocieron dos albúminas 2S aisladas de anacardo y pistacho en immunoblotting (Figura 38). Además no se observó señal cuando el pool de los seis sueros se enfrentaron a otras albúminas 2S de semillas y de otros frutos secos (Figura 39). Datos similares se obtuvieron mediante ELISA cuando los sueros individuales se estudiaron con las albúminas 2S de frutos secos y de semillas (Tabla 25).

RESULTADOS

También se estudió la reactividad cruzada entre las albúminas 2S de la familia Anacardiaceae (Ana o 3 y Pis v 1). Para ello, se realizaron ensayos de inmunoblotting y ELISA inhibición utilizando el pool de sueros con Ana o 3 y Pis v 1 (Figura 40A); la preincubación del suero con Ana o 3 produjo una inhibición parcial del extracto de pistacho. El ensayo de ELISA inhibición (Figura 40B) con proteínas purificadas revelaron reactividad cruzada entre ellas. Pis v 1 inhibió la banda de Ana o 3 con una pequeña cantidad de proteína incluso mejor que Ana o 3 a ella misma, indicando que fuera el pistacho el sensibilizante primario. Ana o 3 inhibió parcialmente la banda de IgE de Pis v 1 sin alcanzar el 100% de inhibición (objetivado en el inmunoblotting). Además se estudió la RC de las albúminas 2S del pistacho y anacardo realizando la inhibición con extractos completos de frutos secos y de semillas (Figura 41). El reconocimiento de esta proteína no se inhibió indicando que la reactividad cruzada entre albúminas 2S debe estar restringida a miembros de la misma familia filogenética como es el caso de las *Anacardiaceae*.

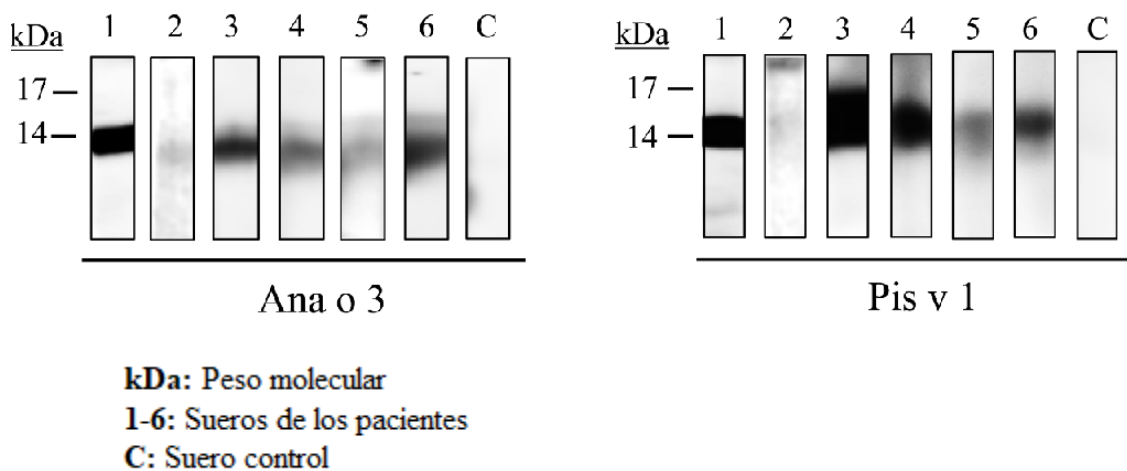


Figura 38. Análisis de la capacidad de unión de IgE de las albúminas 2S (0.2 µg) de anacardo (Ana o 3) y pistacho (Pis v 1) en pacientes con alergia a pistacho y anacardo.

RESULTADOS

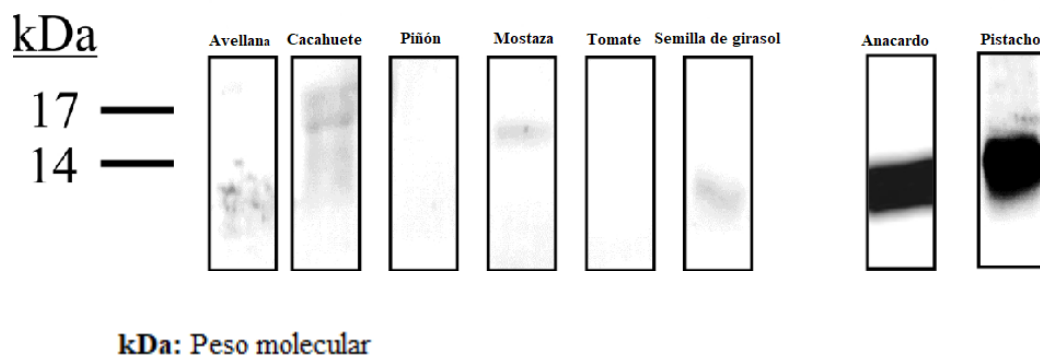


Figura 39. Immunoblotting de albúminas 2S (Cor a 8, Ara h 2, Pin s 1, Sin a 1, semillas de tomate y girasol), anacardo y pistacho con un pool de sueros de pacientes con alergia a pistacho y anacardo.

Paciente Nº	ELISA _{492nm} *							
	Cor a 14	Ara h 2	Pin p 1	Sin a 1	Albúmina 2S Tomate	Albúmina 2S semilla de girasol	Ana o 3	Pis v 1
1	-	-	-	-	-	-	0.56	0.76
2	0	0.057	0.005	0	0	0	0.325	0.2175
3	0	0.1145	0	0	0	0	0.1245	0.301
4	0	0.0925	0	0	0	0	0.155	0.178
5	0.006	0.084	0.011	0.009	0.019	0.002	0.028	0.0285
6	0.006	0.099	0.008	0.002	0.014	0.019	0.147	0.1055

* IgE específica determinada por ELISA (492nm)

Tabla 25. Niveles de IgE específica analizados mediante ELISA

RESULTADOS

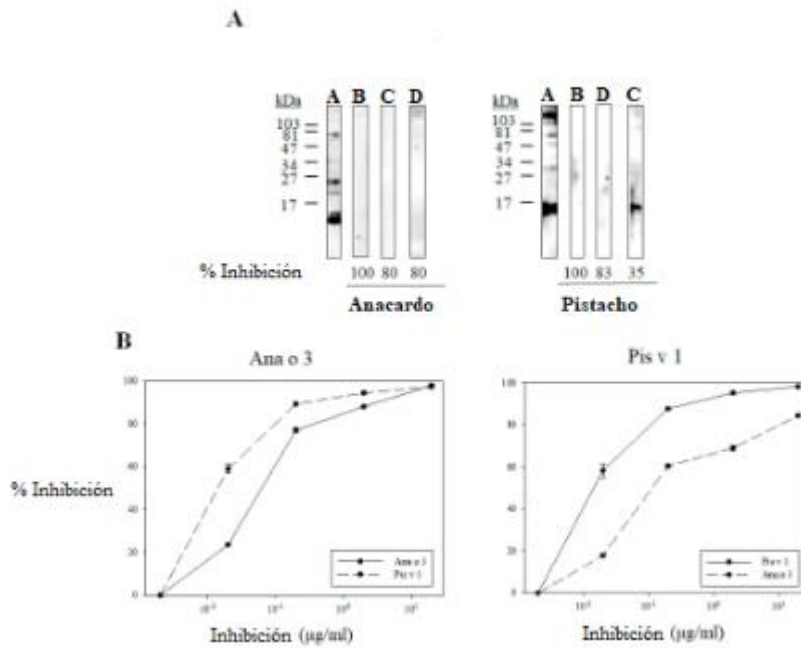


Figura 40 . Reactividad cruzada entre albúminas 2S de pistacho y anacardo. (A) Reconocimiento de inhibición de IgE en extractos de anacardo y pistacho mediante las respectivas albúminas 2S purificadas. (B) ELISA inhibición de Ana o 3 y Pis v 1. En todos los casos se utilizó el mismo pool de sueros de pacientes alérgicos.

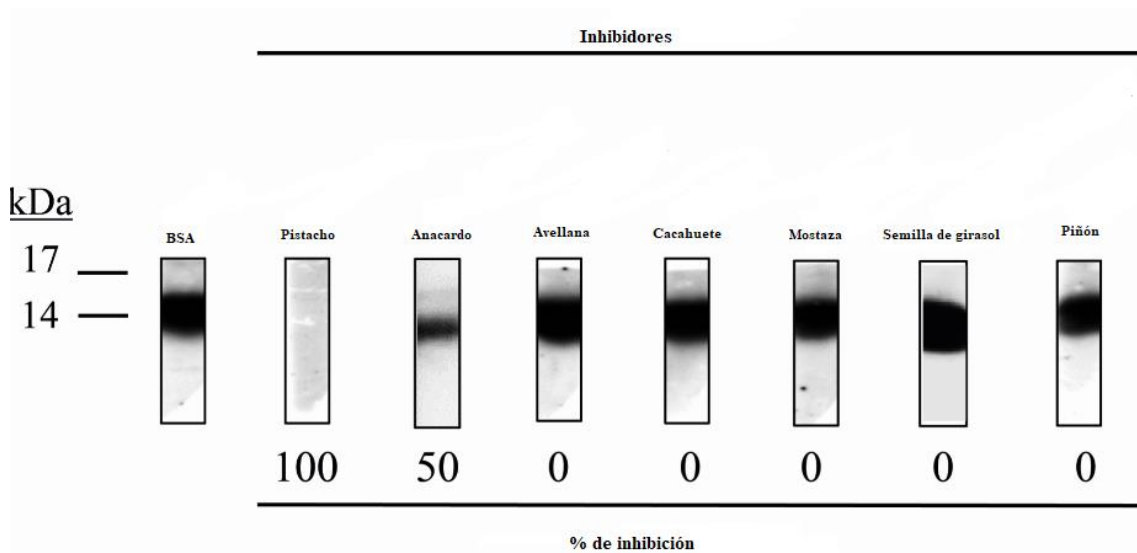


Figura 41. La reactividad cruzada entre pistacho y anacardo por albúminas 2S es propio de la familia *Anacardiaceae*. El ensayo de inhibición se realizó utilizando diferentes extractos de frutos secos y de semillas como inhibidor del reconocimiento de Pis v 1. La inhibición fue observada solamente con los extractos de anacardo y pistacho.



5. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Los frutos secos son un grupo importante en el mundo de la alergia a los alimentos siendo una de las causas más frecuentes de reacciones alérgicas por alimentos. En los diversos estudios de Alergológica realizados por la SEAIC en las últimas décadas (3, 6, 7), los frutos secos fueron el segundo grupo de alimentos que con mayor frecuencia produjo reacciones alérgicas, por detrás de las frutas. A diferencia de las frutas, con gran frecuencia producen reacciones graves que pueden poner en peligro la vida del paciente, lo cual hace que los frutos secos sean un problema de salud no sólo para el paciente, sino para las autoridades sanitarias. En este sentido, hay que añadir que los frutos secos se encuentran entre las causas mas frecuentes de anafilaxia y, por lo tanto, pueden ser un problema grave para la salud y supone una importante disminución de la calidad de vida del paciente, no sólo por los cambios en la dieta de éste, sino también por la preocupación y ansiedad de poder presentar reacciones graves que genera al paciente y/o el entorno familiar. Aunque se está investigando en el tratamiento de estos pacientes (pautas de inducción de tolerancia, inmunoterapia, etc.), la realidad es que en el momento actual el único tratamiento, si exceptuamos el tratamiento de la reacción, es la prevención, evitando la ingestión de los frutos secos causantes de las reacciones. Esta medida es difícil en ocasiones porque los frutos secos se encuentran dentro del grupo de alimentos conocidos como alérgenos ocultos, que son aquellos que pueden ingerirse de forma inadvertida por la dificultad de poder identificar su existencia en el alimento antes de su ingestión.

Además de la frecuencia de las reacciones, la gravedad y las dificultades para su evitación, existen una serie de problemas diagnósticos desde el punto de vista alergológico que dificultan el manejo de estos pacientes, poniendo a prueba la pericia del alergólogo. Así ocurre con el uso de los extractos diagnósticos, tanto para pruebas “in vivo”, como “in vitro”, que al no estar estandarizados es difícil conocer su valor diagnóstico, siendo en ocasiones de dudoso valor. A ello hay que añadir el problema de las reactividades cruzadas y de la atopia latente, pudiendo aparecer pruebas con resultado positivo sin que se acompañen de reacciones alérgicas al ingerir el alimento.

Por otro lado, la alergia a frutos secos tiene muchas caras, pudiendo expresarse la alergia a un determinado alimento de diferentes formas dependiendo de diversos factores. Los avances producidos en los últimos años en biología molecular y en el campo de la proteómica, han permitido desarrollar lo que se conoce como diagnóstico por componentes o diagnóstico molecular y que permite hablar de alergia a determinados alérgenos del alimento además del alimento en sí, lo que confiere unas connotaciones

DISCUSIÓN

interesantes que, en muchas ocasiones, están por describir, mejorando no sólo el diagnóstico de la alergia a frutos secos, sino también el manejo de los pacientes.

En esta investigación se estudian diferentes aspectos de la alergia a frutos secos en el área de Madrid, aportando interesantes y novedosos datos. Siendo imposible abarcar todos los aspectos de la alergia a frutos secos, los objetivos se han centrado en conocer los frutos secos que con mayor frecuencia están implicados en las reacciones alérgicas, estudiar diferencias regionales de alergia a frutos secos en España, estudiar los patrones moleculares implicados en las reacciones, y buscar nuevos síndromes de alergia a frutos secos (Síndrome Pistacho-Anacardo) así como profundizar en el conocimiento de la alergia a las albúminas 2S y en el desconocido campo de la reactividad cruzada de estos alérgenos.

Se planificó un estudio observacional, descriptivo y transversal para desarrollar los objetivos planteados en la investigación. De este modo:

El estudio es **descriptivo** porque el objetivo no es evaluar una hipótesis de trabajo, sino especificar las características de los pacientes con alergia a frutos secos. El proceso de la descripción no es exclusivamente la obtención y la acumulación de datos y su tabulación correspondiente, sino que se relaciona con condiciones y conexiones existentes, etc.

El estudio es **observacional o no experimental** porque no existe manipulación de variables por parte del investigador.

Por último, el estudio es **transversal** porque no existe continuidad en el eje del tiempo.

El objetivo de un estudio transversal consiste en analizar los casos de personas con una cierta afección en un momento dado. Esto es importante dejarlo claro, porque el estudio realizado analiza una foto fija de la enfermedad, en un momento determinado, sin aportar otros datos sobre la evolución, duración de la enfermedad, etc.

El desarrollo de los objetivos del estudio se centró en el diseño de un programa de investigación donde se analizaron diversos grupos de pacientes. Se inició el estudio examinando las características de los pacientes con alergia a frutos secos de la zona de Madrid, que acudieron a consulta de alergia en el Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz. Se siguió con la incorporación al estudio de pacientes de Hospital Universitario Central de Asturias y se compararon aspectos que pudieran ser diferenciales en la alergia a frutos secos entre la población de Madrid y Asturias. Por último, durante

DISCUSIÓN

el desarrollo de la investigación detectamos la existencia de un grupo de pacientes que presentaban un *cluster* de asociación específico de alergia a frutos secos con unas características peculiares que han dado lugar a la descripción de un nuevo síndrome, el Síndrome Pistacho-Anacardo.

Se diseñaron 3 fases bien diferenciadas para alcanzar los diferentes objetivos del estudio.

FASE I: Características de la alergia a frutos secos en Madrid: en esta primera fase se estudiaron pacientes pertenecientes al Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz y se recogieron los datos clínicos de los pacientes con alergia a frutos secos y los resultados de las pruebas cutáneas con extractos comerciales y el alimento natural así como la determinación de IgE específica tanto en ImmunoCAP como en ISAC. Con ello se pudieron fenotipar las características de la alergia a frutos secos de los pacientes que acudieron a la consulta, determinar el patrón molecular de los pacientes y estudiar las correlaciones existentes entre las determinaciones de IgE específica.

FASE II: Búsqueda de patrones geográficos diferenciales en alergia a frutos secos en España: en esta fase se estudiaron los patrones diferenciales en alergia a frutos secos entre los pacientes de Madrid (Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz) y Asturias (Hospital Universitario Central de Asturias), dos regiones de España con características ambientales y geográficas bien diferenciadas.

FASE III: Búsqueda de nuevos patrones de alergia a frutos secos: Síndrome Pistacho-Anacardo: se detectó un grupo de pacientes con alergia selectiva a pistacho y anacardo por lo que decidimos analizar este grupo de pacientes durante el estudio. Esta fase del estudio nos permitió profundizar en el análisis de la reactividad cruzada entre las albúminas 2S de frutos secos y semillas y avanzar en el conocimiento de la alergia a las albúminas 2S, un campo poco explorado en la actualidad.

5.1 FASE I: Características de la alergia a frutos secos en Madrid

5.1.1 Pacientes

Edad y sexo

La alergia a frutos secos puede desarrollarse a cualquier edad, aunque suele presentarse en los 2 primeros años de vida (193). Revisando la bibliografía existente sobre la edad de alergia a frutos secos, es difícil establecer una cifra determinada, pues la mayoría de los estudios están sesgados por limitarse al estudio de la población infantil o adulta. Según los datos publicados en el metanálisis realizado por McWilliam y col., (131), la mayoría de los estudios sobre alergia a frutos secos se centraron en la población de niños y adolescentes, mientras que la minoría estudian conjuntamente la población infantil y adulta.

Los pacientes incluidos en nuestro estudio presentaron una edad media de $30 \pm 13,5$ años con un rango de 63 años comprendido entre 3 y 66 años. Nuestra muestra de estudio incluye tanto niños como adultos, pero debemos dejar claro que tiene un sesgo con predominio de adultos con respecto a niños. Esto es debido a que por las características de nuestro centro, los niños que acuden para estudio de su enfermedad alérgica se reparten entre los Servicios de Alergia y Pediatría.

Según los datos del estudio Alergológica que determinó el porcentaje de alergia a frutos secos en diferentes grupos de edad en España, los resultados muestran que los frutos secos fueron responsables del 5% de las reacciones alérgicas en los niños menores de 5 años, siendo el agente etiológico del 36% de las alergias producidas por alimentos en la población de niños mayores de 5 años, adolescentes y adultos (6). En este estudio también se comprobó que del total de los niños alérgicos a frutos secos con una edad inferior a 15 años, el 12% eran menores de 5 años, el grupo mas prevalente era la edad entre 5 y 10 años con una frecuencia del 53% y el 35% tenía una edad comprendida entre 10 y 15 años.

Es muy importante dejar constancia de los datos referentes a la edad de los pacientes incluidos en el estudio, porque como se ha observado en otros estudios (101, 209, 210) puede condicionar el tipo de alergia que presentan los pacientes y es muy importante tenerlo en cuenta a la hora de valorar los hallazgos obtenidos, en este caso en nuestra población.

DISCUSIÓN

Según los datos de Fernández-Crespo y col., (211) sobre alergia a frutos secos en la población infantil, la mayor frecuencia de inicio de las reacciones alérgicas por frutos secos ocurre en el primer y segundo año de vida como edad de inicio. En nuestro estudio, el inicio de la alergia a frutos secos fue a partir de los 2 años, con una edad media de debut de 20,7 años. Esta diferencia queda claramente explicada por los sesgos que hemos comentado anteriormente, ya que una población del estudio referido (211) se centra en la población infantil y la nuestra corresponde a una población general con predominio de adultos.

Con respecto al sexo, los resultados de nuestro estudio mostraron un ligero predominio de varones con respecto a las mujeres (53,1 % vs. 46,9 %), si bien la diferencia no fue estadísticamente significativa. Los resultados publicados de diferentes estudios (212-214) así como los de Alergológica (3) muestran un discreto predominio del género femenino en lo referente a la alergia en general, así como en alergia a alimentos, donde existía un predominio de la población femenina (56,4%) cifra, publicada por ésta última.

5.1.2 Alergia a polen

Los pacientes con alergia a alimentos presentan una mayor incidencia de enfermedades atópicas (rinitis, asma y/o dermatitis atópica) (215). Este es un hecho fácilmente explicable porque forma parte de lo que se conoce como marcha alérgica del paciente atópico, donde a lo largo de la vida pueden aparecer diferentes enfermedades alérgicas. En nuestro estudio, el 81,6% del total de los pacientes presentaron enfermedad alérgica respiratoria. Todos ellos asociaban síntomas de rinitis y asma bronquial. Estos datos son acordes con los resultados del estudio Vegetalia (73), donde un 70-80% de los pacientes con alergia a alimentos de origen vegetal presentaron asociados síntomas de polinosis.

5.1.3 Síntomas con frutos secos, así como con otros alimentos vegetales

5.1.3.A Frutos secos

Los frutos secos que con mayor frecuencia fueron responsables de las reacciones alérgicas en los pacientes de nuestro estudio fueron la nuez (65,3%), la avellana (57,1%), el cacahuete (46,9%) y la almendra (42%). Nuestros resultados no difieren de los obtenidos en el estudio Vegetalia (73) en el que la nuez fue la causa del mayor número de reacciones alérgicas por frutos secos, aunque la frecuencia de alergia a avellana, almendra y cacahuete fue muy próxima.

DISCUSIÓN

Es conocido y reiterado por muchos autores que la prevalencia de alergia a frutos secos es difícil de determinar (216). Entre sus causas destacan además de la variabilidad regional, la ausencia de pruebas diagnósticas que confirmen la historia clínica referida por los pacientes o incluso recogidas a través de encuesta telefónica. En este sentido, los datos del estudio de Sicherer y col., (149) recogidos mediante una encuesta telefónica mostraron que los alimentos más frecuentemente implicados y por orden de frecuencia fueron nuez (34%), anacardo (20%), almendra (15%), nuez pecana (9%) y pistacho (7%). Obviamente, el cacahuete que es el fruto seco que con mayor frecuencia produce alergia a frutos secos en EEUU, no aparece incluido aludiendo a que es una legumbre y por tanto no se recoge en el estudio. No obstante debemos añadir que la clasificación de frutos secos no corresponde a clasificación taxonómica y no tiene relación biológica, pues si el cacahuete es una leguminosa que pertenece a la familia *Fabaceae*, la almendra pertenece a la familia *Rosaceae*, la nuez a la familia *Juglandaceae*, el pistacho a la familia *Anacardiaceae*, etc.

Recientemente McWilliam y col., (131) realizaron un estudio revisando y analizando la prevalencia individual de alergia a este grupo de alimentos dependiendo de la localización geográfica. Los resultados fueron muy interesantes encontrando que la avellana era el fruto seco que con mayor frecuencia producía reacciones alérgicas en Europa (17-100%); la nuez (20-30%) y el anacardo (15-30%) en EEUU y, por último, la nuez de Brasil en Inglaterra (24-33%). Estos datos fueron posteriormente confirmados en la revisión realizada por Weinberger y col., (217).

A la vista de los resultados de estos estudios, nuestros datos aportan información diferencial respecto a la alergia a frutos secos en Europa, pues en España (en concreto en la zona centro) el fruto seco que con mayor frecuencia produce alergia es la nuez y que probablemente estas diferencias tienen su explicación a nivel molecular. También debemos adelantar, como veremos posteriormente, que en algunas regiones de España la avellana es el fruto seco responsable del mayor número de reacciones alérgicas, también explicado por diferencias medioambientales y moleculares.

Atendiendo a la sintomatología presentada por los pacientes tras la ingestión de frutos secos, se objetivó un claro predominio de síntomas sistémicos (73,4%) frente a síntomas leves localizados en la cavidad oral (26,5%). Estos datos son acordes a lo descrito en algunos estudios por tres razones: se ha asociado la coexistencia de atopía con la gravedad

DISCUSIÓN

de los síntomas (218) y recordemos que en nuestro estudio un elevado porcentaje de los pacientes asociaban enfermedad respiratoria, que los frutos secos son responsables del 18%–40% de anafilaxias (219, 220) y que en el sur de Europa predomina un patrón nsLTP responsable de producir reacciones graves (124). El estudio realizado por Cuesta y col., (221) en pacientes con alergia a melocotón detectaron que los pacientes sin alergia a polen presentaron con mayor frecuencia reacciones sistémicas, si bien el mayor número de reacciones graves ocurrió entre los pacientes polínicos por ser el grupo más numeroso.

Otro dato relevante de nuestro estudio fue que la nuez fue el fruto seco que con mayor frecuencia produjo síntomas sistémicos y síntomas localizados en la cavidad oral y aunque con menor frecuencia, la avellana y el cacahuete también fueron responsables de producir clínica sistémica. Según diversos estudios donde han analizado el tipo de reacción producida por los diferentes frutos secos, el cacahuete, la nuez de Brasil y el anacardo se han relacionado con la aparición de síntomas sistémicos (222, 223) y la avellana y la almendra con la afectación de la cavidad oral (224).

5.1.3.B Otros alimentos vegetales

En nuestro estudio, un 81,6% de los los pacientes con alergia a frutos secos presentaron síntomas al comer otros alimentos de origen vegetal. El más frecuente fue el melocotón (57,4%), seguido del kiwi y del melón (32,6% ambos). Estos resultados son coherentes con los obtenidos en el estudio de la RETIC (Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud) Vegetalia (73). Numerosos estudios han asociado la alergia a frutos secos a alergia a otros alimentos de origen vegetal y más concretamente a frutas (108, 225). En España, el melocotón es la fruta que por excelencia produce un mayor número de reacciones alérgicas (107) por lo que se han realizado numerosos estudios sobre la asociación de esta fruta con la alergia a frutos secos como el realizado por Lázaro y col., (226) en el que un 49% de los pacientes con alergia a melocotón también lo era a frutos secos (almendra-28%, nuez-27% y avellana-26%) y el realizado por Figueredo y col., (227) detectando una asociación entre la alergia a cucurbitáceas con frutos secos, siendo la nuez el más frecuente (35%).

5.1.4 Tiempo de latencia de las reacciones. Cantidad mínima causante de la reacción

Es muy frecuente que las reacciones alérgicas a frutos secos, al ser por lo general reacciones mediadas por IgE, se presenten de forma inmediata y tras la ingestión de una mínima cantidad (228). Esto fue corroborado por nuestro estudio en el que detectamos que 84% de los pacientes alérgicos a frutos secos presentaron síntomas en los primeros 30 minutos. Un intervalo inferior a 5 minutos fue referido por la mayoría de los pacientes y entre 2 a 5 piezas la cantidad mínima implicada en la reacción. Hasta un 12,2% de los pacientes presentaron síntomas tras la ingestión de los frutos secos como alimento oculto. Esta última cifra no debe pasar desapercibida dado que existen diversos estudios donde los frutos secos continúan siendo uno de los alérgenos ocultos mayormente implicados en las reacciones alérgicas. Este es el caso del trabajo publicado en EEUU por Vierk y col., (229) donde el cacahuete fue considerado el segundo alérgeno oculto, por detrás del huevo, responsable de producir con mayor frecuencia reacciones graves y amenazantes para la vida.

5.1.5 Requerimiento de tratamiento ambulatorio

El 32,6% de los pacientes de nuestro estudio que presentaron una reacción alérgica tras la ingestión de frutos secos precisaron atención en Urgencias, de los cuales un 51% recibió tratamiento durante la reacción. El tratamiento que con mayor frecuencia se administró fue antihistamínicos en asociación con corticoides im. Llama la atención que a pesar de que los frutos secos producen reacciones graves, hecho objetivado en nuestro estudio, y que siendo la adrenalina el tratamiento de elección (230), sólo un 12% de los pacientes refirió haber recibido tratamiento con adrenalina y siguen siendo otros fármacos los que se prescriben con mayor frecuencia ante reacciones alérgicas por este grupo de alimentos (228).

5.1.6 Implicación de cofactores

Los resultados de nuestro estudio detectaron una asociación inapreciable (2%) entre la presencia de cofactor en las reacciones alérgica por frutos secos siendo el ejercicio físico el implicado. El alcohol, el ejercicio físico y los (AINEs) son los cofactores más frecuentemente descritos en la literatura (42, 231-233) Revisando la bibliografía encontramos numerosos estudios implicando la asociación de cofactor en el

DISCUSIÓN

desencadenamiento de una reacción alérgica grave por alimentos de origen vegetal en el área mediterránea. Con frecuencia la proteína transportadora de lípidos (nsLTP) fue el alérgeno responsable de estos cuadros. Sin embargo, otros alérgenos como la omega-5 gliadina ha sido el alérgeno más frecuentemente implicado en la anafilaxia por ingestión de trigo dependiente de ejercicio (233, 234). Cardona y col., (233), estudiaron una serie de 71 pacientes con alergia alimentaria exacerbada por cofactor siendo los alimentos vegetales (lechuga y cereales con mayor frecuencia) los más frecuentemente implicados y dependientes de nsLTP. Esto fue posteriormente corroborado por Muñoz-García y col., (235) al estudiar una población de 30 pacientes con alergia a lechuga. En este estudio encontraron con gran frecuencia la existencia de cofactor, generalmente ejercicio, implicado en las reacciones alérgicas y donde el alérgeno mas frecuentemente implicado fue la nsLTPs.

La asociación de cofactores en el desarrollo de reacciones sistémicas también se ha asociado a otros alimentos de origen vegetal (236, 237). En un estudio reciente realizado por Mota y col., (238) que incluyó a 43 pacientes con alergia a nsLTP, el 16% requirieron la asociación de ejercicio físico como cofactor, estando implicados los frutos secos como los alimentos responsables en el 42,8% de los casos.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en nuestro estudio difieren de lo publicado dado que nuestra población no posee una alergia alimentaria exacerbada por cofactor a pesar de tener un patrón nsLTP predominante.

5.1.7 Pruebas cutáneas

5.1.7.A Pruebas cutáneas con pólenes

Acorde con la relación existente entre la alergia a alimentos y la alergia a pólenes, en nuestro estudio se objetivó que el 81,6% de los pacientes eran polínicos. Estos resultados fueron similares a los detectados por varios estudios de alergia a alimentos donde el porcentaje de pacientes con polinosis fue del 100% en pacientes con alergia a melón (227), del 80% en alérgicos a melocotón (221) del 79% en alérgicos a kiwi (239) y del 88% en pacientes alérgicos a manzana (31).

Las pruebas con pólenes detectaron sensibilización a gramíneas, arizónica, plátano de sombra, olivo y plantago con mayor frecuencia, siendo menor la detectada para otros pólenes como el polen de abedul (47%) En el estudio multicéntrico realizado por Cuesta

DISCUSIÓN

y col., (73) incluyeron a 806 pacientes con alergia a alimentos para evaluar las diferencias entre los pacientes con/sin alergia a pólenes se detectó un incremento estadísticamente significativo en la sensibilización a algunos pólenes como el polen de plantago o el polen de abedul entre en el grupo de pacientes con alergia a pólenes y a alimentos de Madrid. Los resultados de nuestro estudio también detectaron una sensibilización incrementada a polen de abedul en los pacientes alérgicos a frutos secos.

5.1.7.B Pruebas cutáneas con LTP y profilina

Los resultados de nuestro estudio mostraron un predominio de sensibilización a nsLTP (75,5%) frente a profilina (34,6%) y un 28,6% presentaron sensibilización a ambas. Estos resultados confirman los objetivados en diferentes estudios donde Pru p 3 fue el alérgeno mayoritario en España y de otras regiones mediterráneas, el cual presenta reactividad cruzada con las nsLTPs de frutos secos (240). En un estudio realizado en España (124) se detectó una sensibilización a Pru p 3 del 62% en los pacientes con alergia a melocotón. Posteriormente estos resultados fueron confirmados al realizar un estudio a nivel Europeo detectándose una elevada sensibilización a Pru p 3 en pacientes con alergia a manzana muy probablemente debido a la gran asociación entre alergia a melocotón y a manzana en España (89,9%) (31).

Sin embargo, la profilina es un panalérgeno cuya sensibilización se ha asociado frecuentemente a la sensibilización a polen de gramíneas y a frutas. Con respecto a la frecuencia de sensibilización mediante prueba cutánea, diversos estudios realizados en España han detectado diferencias importantes; Asturias y col., (241) objetivaron una sensibilización del 56% mientras que el grupo de Asero y col., (242) detectó una sensibilización inferior (20%).

5.1.7.C Pruebas cutáneas con alimentos (extractos comerciales)

En nuestro estudio se analizaron los resultados de las pruebas cutáneas con extractos comerciales de frutos secos siendo por orden de frecuencia de resultados positivos el pistacho (77,5%) seguido del cacahuete y piñón (69,3%), avellana (68,2%) castaña (65,3%), nuez (61,2%), semilla de girasol y almendra (53%). Además, del total de los pacientes diagnosticados a cada uno de los frutos secos, los extractos comerciales que mejor funcionaron en el diagnóstico de alergia a frutos secos fueron el pistacho, semilla de girasol, castaña, cacahuete y piñón siendo positivos en más de un 85% de los pacientes.

DISCUSIÓN

Otros extractos como el de nuez, avellana y almendra fueron positivos en un 78%, 64,2% y 57,14% respectivamente. Siguiendo las recomendaciones de Stiefel y col., (243) que elaboraron una guía sobre el diagnóstico y manejo de los pacientes con alergia a frutos secos, se debe realizar una evaluación minuciosa de estas pruebas, ya que en ocasiones pueden producir falsos negativos por la mala calidad de los extractos o falsos positivos por la frecuente reactividad cruzada entre ellos, por lo que deben ir obligatoriamente respaldadas por una historia clínica claramente compatible con un cuadro alérgico o con pruebas de provocación.

Con respecto a la sensibilización a frutas, el melocotón fue el más frecuente con una frecuencia del 75% seguido del kiwi (51%) y melón (46,9%) mientras que la sensibilización a otras frutas fue menor. Estos resultados son coherentes con los detectados en el estudio vegetalia (73).

5.1.8. ImmunoCAP

Los resultados de nuestro estudio detectaron que un elevado porcentaje de pacientes estaba sensibilizado, mediante la determinación de IgE específica, a extractos completos: más de un 90% a cacahuete, nuez y almendra, un 87,5% para castaña y avellana, objetivándose una frecuencia menor para pistacho, anacardo y piñón. Estos datos serían similares a los descritos por Griffiths y col., (244) que proponen esta técnica como método de elección para el estudio de alergia a frutos secos.

Con respecto al patrón de sensibilización detectado en nuestra población y, acorde al detectado en nuestro trabajo mediante otras técnicas, se objetivó un claro predominio de la sensibilización a nsLTP (71,4% para Pru p 3, 61,2% para Ara h 9 y 44,9% para Cor a 8) seguido de Phl p 12 (20,4%) y Bet v 1 (12%). Este mismo patrón se mantuvo al estudiar cada uno de los frutos secos más frecuentemente implicados en las reacciones alérgicas en nuestra población: nuez, avellana, cacahuete y almendra.

Al revisar la bibliografía sobre los patrones de sensibilización detectados en distintos países del mundo, encontramos diferentes patrones dependiendo de la localización geográfica. En Europa, Hansen y col., (126) realizaron un estudio multicéntrico con la finalidad de analizar el patrón de sensibilización mediante ImmunoCAP en pacientes con alergia a avellana pertenecientes a tres países de Europa (España, Dinamarca y Suiza)

DISCUSIÓN

detectando importantes diferencias. Mientras en los países del norte y centro de Europa (Dinamarca y Suiza) se detectó una sensibilización a Cor a 1.04 (PR-10) en el 100% de los pacientes, en España sólo un 18% estaban sensibilizados a esta proteína, siendo predominante la sensibilización a Cor a 8 (71%), proteína transportadora de lípidos (nsLTP). Otro estudio interesante fue el publicado por Vereda y col., (189) en pacientes con alergia a cacahuete en Nueva York (EEUU), Estocolmo (Suecia) y Madrid (España). En este estudio se confirmó el predominio de las proteínas de reserva en los pacientes de Nueva York, especialmente una albúmina 2S (Ara h 2) y una vicilina (Ara h 1); proteínas PR-10 (Ara h 8) en Estocolmo y nsLTPs en Madrid (Ara h 9). Los diferentes patrones se acompañaron a su vez de diferente gravedad en la expresión de la alergia a cacahuete.

Al revisar la bibliografía también encontramos diferentes patrones dependiendo de la edad, con predominio de sensibilización a proteínas de reserva en alergia a frutos secos en los primeros años de vida independiente de la localización geográfica y a medida que son mayores se produce un descenso en la frecuencia de sensibilización a proteínas de reserva, predominando ahora la sensibilización a proteínas PR-10 en centro y norte Europa o proteínas nsLTPs en España (101, 209, 245).

En nuestro estudio, el 82,6% de los pacientes con alergia a cacahuete eran adultos y el 17,4% niños. El 78,9% de los adultos estaban sensibilizados a Ara h 9 y ninguno de ellos a Ara h 1, Ara h 2 ni Ara h 3. Sin embargo en la población infantil con alergia cacahuete, el 50% estaban sensibilizados a Ara h2, Ara h 3, Ara h 9 y el 75% a Ara h 1.

5.1.9. ISAC

En nuestro estudio, la sensibilización a diferentes alérgenos purificados por técnica de ISAC presentó un predominio de sensibilización a las proteínas nsLTPs, destacando una frecuencia de sensibilización del 61,1% a Pru p 3, 50% a Cor a 8 y un 41% a Ara h 9. A mayor distancia se encontró la sensibilización a profilina (Phl p 12) con un 31,4% y del 5,2% para proteínas PR-10 (Bet v1).

Recientemente Goikoetxea y col., (246) compararon la rentabilidad diagnóstica de la sensibilización a proteínas purificadas de frutos secos (cacahuete, avellana y nuez) mediante dos técnicas diferentes, ImmunoCAP y micromatriz comercial de proteínas alérgicas. Incluyeron un total de 39 pacientes con alergia a cacahuete, 36 con alergia a avellana y 44 con alergia a nuez, todos ellos mayores de 14 años. Los resultados

DISCUSIÓN

detectaron principalmente sensibilización a nsLTPs mediante técnica de ISAC, 66,6% a Ara h 9 en alergia a cacahuete, el 80,5% a Cor a 8 en alergia a avellana y el 70,4% a Jug r 3 en los alérgicos a nuez. Sin embargo en 13 pacientes (33,3%) con alergia a cacahuete no se detectó sensibilización alguna mediante esta técnica por lo que en este grupo (alérgicos a cacahuete) se determinaron los niveles de IgE específica frente a Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 8 y Ara h 9 mediante ImmunoCAP y Ara h 6 mediante ELISA detectándose que 8 de estos pacientes estaban sensibilizados a Ara h 9, de los cuales 5 estaban sensibilizados a Ara h 6 mediante ELISA. En ninguno de ellos se detectó sensibilización a Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, o Ara h 8. Concluyeron que el diagnóstico de alergia a avellana y a nuez era adecuado mediante esta técnica, pero no con Ara h 9 donde fue muy superior la rentabilidad alcanzada por técnica de ImmunoCAP (94,4% vs 72,2%). Posteriormente Griffiths y col., (244) compararon nuevamente ambas técnicas (ImmunoCAP e ISAC) proponiendo la determinación por ImmunoCAP como técnica de elección para el diagnóstico de alergia a frutos secos (71%-ImmunoCAP vs 65%-ISAC). Mediante los resultados de nuestro estudio se confirmó la menor sensibilidad de la técnica de ISAC para detectar sensibilización a Ara h 1, Ara h 2 y Ara h 3.

5.1.10 Estudio de correlaciones

Al analizar los niveles de IgE específica, se detectaron las correlaciones existentes entre la sensibilización a frutos secos mediante la determinación de los niveles de IgE específica a través de dos técnicas de diagnóstico molecular: ImmunoCAP e ISAC.

Mediante ImmunoCAP se estudió primero la sensibilización entre extractos completos de los distintos frutos secos, seguido de la detectada entre las diferentes nsLTPs disponibles comercialmente y por último la existente entre extractos completos y nsLTPs.

Los resultados detectaron una correlación muy alta de la unión de IgE entre el pistacho y el anacardo, dos miembros de la familia *Anacardiaceae*, hecho que puede explicarse porque son frutos secos relacionados taxonómicamente y por tanto no sólo comparten proteínas homólogas sino con gran proximidad biológica y alta identidad de secuencia entre sus proteínas.

Al analizar la correlación entre nsLTPs (Art v 3, Cor a 8, Ara h 9 y Pru p 3) se objetivó una correlación alta entre todas ellas siendo mayor la detectada entre Pru p 3 y Ara h 9 ($r=0.95$, $p<0.001$) y menor la detectada entre Cor a 8 y Art v 3 ($r=0.71$ $p<0.001$).

DISCUSIÓN

Revisando la bibliografía sobre las propiedades alergénicas de las nsLTPs se han realizado varios estudios como el publicado por Hartz y col., (247). Estos investigadores analizaron por un lado la correlación existente entre nsLTPs de frutas rosáceas como ocurrió entre Pru p 3 de melocotón y Pru av 3, la LTP de cereza; y por otro lado la correlación entre el melocotón y frutos secos al evaluar Pru p 3 de melocotón con Cor a 8 de avellana. Se objetivó que en pacientes con alergia a melocotón existía una elevada correlación con nsLTPs de otras rosáceas (Pru p 3 vs Pru av 3), una correlación moderada con nsLTPs de una familia distinta a las rosáceas (Pru p 3 vs Cor a 8) independientemente de que existiera o no alergia a cereza o avellana y débil entre Pru p 3 y Cor a 8 cuando no presentaban alergia a melocotón. También se estudió (248) la correlación entre Pru p 3 y otras nsLTPs (Mal d 3, Ara h 9m Art v 3, Cor a 8 y Par j 2) en una población del noroeste de Europa objetivando una alta correlación con Mal d 3 ($r=0.91$), siendo inferior a la encontrada por nuestro grupo para Cor a 8= 0.69; Ara h 9= 0.53, Art v 3= 0.48 y Par j 2= 0.37.

Por último y al comparar los niveles de IgE específica de los extractos completos de los distintos frutos secos (cacahuete, avellana, almendra, castaña, pistacho, piñón, anacardo, semilla de girasol y nuez) y de las nsLTPs (Art v 3, Ara h 9, Cor a 8, Pru p 3) se detectó una correlación muy débil o prácticamente nula entre el pistacho y anacardo con las distintas nsLTPs a diferencia de la detectada entre otros frutos secos. Este hecho puede ser explicado porque hasta la fecha no se han descrito proteínas transportadoras de lípidos en ambos frutos secos.

Mediante ISAC se estudió la correlación entre 7 nsLTPs (Art v 3, Pru p 3, Cor a 8, Ara h 9, Jug r 3, Tri a 14 y Par j 2) siendo elevada entre Art v 3, Pru p 3, Cor a 8, Ara h 9, Jug r 3; moderada para Tri a 14 y Pru p 3 ($r= 0.47$, $p=0.004$), Tri a 14 y Cor a 8 ($r= 0.56$, $p<0.001$) así como para Tri a 14 y Jug r 3 ($r= 0.52$, $p<0.001$). No se detectó correlación con Par j 2. Estos resultados son similares a los detectados por un estudio realizado por Scala y col., (249) que incluyeron el estudio de 568 pacientes con la finalidad de analizar la correlación entre nsLTPs (Art v 3, Cor a 8, Jug r 3, Pla a 3, Pru p 3 and Tri a 14) mediante ISAC objetivándose una correlación moderado-elevada y estadísticamente significativa para todas las proteínas siendo menor para Tri a 14 y el resto de nsLTPs acorde con nuestros hallazgos. Mediante esta técnica tampoco se detectaron correlaciones débiles entre estas proteínas.

5.2 FASE II: Búsqueda de patrones geográficos diferenciales en alergia a frutos secos en España

Los resultados del estudio realizado en los pacientes con alergia a frutos secos de Madrid se compararon con los obtenidos del análisis de la alergia a frutos secos en Asturias. Los hallazgos resultantes de la investigación demostraron que la nuez, la avellana y el cacahuete fueron los alimentos que con mayor frecuencia produjeron reacciones alérgicas en ambas regiones de España. A pesar de esta concordancia entre los resultados, se encontraron importantes diferencias en el patrón molecular en alergia a frutos secos, no sólo entre ambas regiones, sino también entre los diferentes frutos secos entre sí en Asturias. Esta diferencia en patrón molecular estuvo ligada a la frecuencia de reacciones sistémicas sufridas por los pacientes.

Los frutos secos son una causa frecuente de alergia en el mundo y responsable de reacciones alérgicas graves, que con frecuencia ponen en peligro la vida de los pacientes. España es probablemente uno de los ejemplos más típicos de alergia a alimentos mediada por sensibilización a nsLTPs (31, 73, 101, 141, 189, 250).

En el estudio hemos evaluado las características de la alergia a los frutos secos que con mayor frecuencia son responsables de las reacciones en dos regiones bien diferenciadas de España por sus características, Madrid y Asturias. Con sólo una distancia de 400 kilómetros entre ellas, existen importantes diferencias medioambientales entre ambas. Madrid tiene un clima continental donde la alergia respiratoria principal es la producida por los pólenes, especialmente el de gramíneas. Asturias tiene un clima marítimo con una elevada humedad relativa y donde los principales agentes causantes de reacciones alérgicas respiratorias son los ácaros del polvo doméstico.

Un resultado interesante, digno de ser subrayado desde nuestro punto de vista, fue el porcentaje de sensibilizaciones objetivadas en las pruebas cutáneas con los extractos de polen de abedul, donde el porcentaje de resultados positivos fue similar en ambas regiones (47% en Madrid y 42,8% en Asturias), sin diferencias estadísticamente significativas. Curiosamente, al evaluar las sensibilizaciones primarias responsables a nivel molecular encontramos que el 12% de los pacientes de Madrid estuvieron sensibilizados a Bet v 1, mientras que en Asturias el 42,9% de los pacientes estuvieron sensibilizados a Bet v 1, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Este es un dato curioso y

DISCUSIÓN

relevante, debiendo recordar que Madrid es un área con ausencia o niveles bajos de polen de abedul en la atmósfera y Asturias con niveles moderados representa una de las zonas, junto con Galicia, donde existe mayor concentración atmosférica de polen de abedul en España. No obstante, el considerable porcentaje de pacientes sensibilizados a polen de abedul entre los pacientes con alergia a alimentos del área de Madrid con un bajo porcentaje de sensibilización a Bet v 1 había sido previamente reportado (73). Una explicación de estas diferencias sería que la sensibilización a abedul en la región de Asturias está producida por sensibilización primaria al polen de abedul, mientras la sensibilización a polen de abedul en la región de Madrid sea consecuencia de reactividad cruzada con otros alérgenos.

La nuez, la avellana y el cacahuete fueron los frutos secos que con mayor frecuencia produjeron reacciones alérgicas en ambas regiones y por ello, el estudio comparativo de los patrones a nivel molecular lo focalizamos en estos alimentos. La nuez fue más frecuente en Madrid, pero hubo pequeñas diferencias en la prevalencia a frutos secos en Asturias, donde la avellana fue el fruto seco responsable del mayor número de reacciones alérgicas, aunque las diferencias no tuvieron significación estadística. Estos resultados, tal y como discutimos en el apartado anterior, son muy diferentes de los publicados por McWilliam y col., (131) al analizar la prevalencia a nivel mundial. Estas diferencias podrían explicarse por el alérgeno a nivel molecular implicado en la producción de las reacciones alérgicas, ya que, como se estableció previamente, la nsLTP fue el alérgeno principal que habitualmente es responsable de la alergia a alimentos vegetales en España (101, 141, 189, 250).

Otro resultado importante y que debe ser subrayado fue el encontrado al analizar el patrón alergénico involucrado a nivel molecular en las reacciones alérgicas. Por un lado, hubo un patrón predominante de sensibilización nsLTP en la región de Madrid, lo cual fue concordante con otros estudios publicados previamente sobre alergia a frutos secos en España (101, 141, 189, 250). Además, este patrón fue similar y repetitivo al evaluar el patrón molecular involucrado en los distintos frutos secos al analizarlos de forma individualizada (nuez, avellana o cacahuete). Por otro lado, el patrón responsable de la alergia a frutos secos fue diferente, debiendo enfatizar que estuvo repartido entre sensibilizaciones a nsLTP y Bet v 1 por un igual, si bien el patrón varió notablemente de un fruto seco a otro al evaluar el alérgeno principal implicado. Así el patrón predominante

DISCUSIÓN

en alergia a avellana fue la sensibilización a Bet v 1, el patrón predominante en alergia a cacahuete estuvo determinado por sensibilización a nsLTP. Por último, el patrón de alergia a nuez fue compartido por sensibilizaciones a Bet v 1 y nsLTP. Estos datos son especialmente relevantes porque es la primera vez que se describen diferentes patrones moleculares de alergia a frutos secos en diferentes regiones de España, pero además el patrón predominante en una misma zona (Asturias) cambió dependiendo del fruto seco causante de alergia. No obstante, somos conscientes de que estos resultados deberían ser confirmados por los estudios de otros investigadores y con un mayor número de pacientes.

Los resultados de este estudio, junto con los resultados de otros estudios de frutos secos en la población española (31, 101, 141, 189, 250), indican que en España coexisten 3 patrones diferentes de alergia a frutos secos: un patrón nsLTP, el patrón más frecuente en la mayoría de las regiones de España en la población adulta y en niños mayores (> de 5 años); un patrón PR-10 o Bet v 1, el cual es significativo en áreas con pacientes sensibilizados a Bet v 1 y dominado por alergia a avellana; y, finalmente, un patrón de proteínas de reserva (albúminas 2S) en la población infantil menor de 5 años. Además, los diferentes patrones suelen acompañarse de una diferente gravedad de expresión de la alergia, siendo grave para las proteínas de almacenamiento, moderada para las nsLTPs y leve para las proteínas PR-10.

5.3 Fase III: Búsqueda de nuevos patrones de alergia a frutos secos: Síndrome Pistacho-Anacardo

Durante el estudio, se detectó un grupo de pacientes con alergia selectiva a pistacho y anacardo con buena tolerancia a frutos secos y prueba cutánea e IgE específica negativa frente a otros frutos secos por lo que decidimos caracterizar este grupo de pacientes.

Al estudiar el alergograma detectado en la inmunotinción realizada con el suero de los pacientes encontramos bandas con un peso molecular aparente de 14 kDa. La caracterización de dichas bandas nos permitió identificarlas mediante espectrometría de masas como albúminas 2S.

Al disponer de las albúminas 2S purificadas y caracterizadas pudimos analizar la capacidad de unión de IgE de los sueros de los pacientes a estas proteínas y evaluar el grado de reactividad cruzada entre ellas. Los resultados obtenidos de este análisis confirmaron que había un subgrupo significativo de pacientes sensibilizados a Pis v 1 y

DISCUSIÓN

Ana o 3, albúminas 2S de pistacho y anacardo respectivamente, que presentaron reactividad cruzada entre sí, pero no con las albúminas 2S procedentes de otros frutos secos y semillas.

El anacardo y el pistacho pertenecen a la familia *Anacardiaceae* en la cual se ha incluido el mango como fuente alergénica (251). Es importante destacar que este subgrupo de pacientes puede comer otros frutos secos sin presentar reacción alérgica alguna así como pulpa de mango dado que las albúminas 2S se localizan en las semillas del mango (152).

Este grupo con las características descritas anteriormente se caracteriza por la sensibilización exclusiva a albúminas 2S y no a otras proteínas como nsLTPs, vicilinas (globulinas 7S) y/o leguminas (globulinas 11S), proteínas de reserva responsables de reactividad cruzada entre frutos secos, incluidos pistacho y anacardo y cuya reactividad cruzada está ausente entre las albúminas 2S de las anacardiáceas y el resto de frutos secos. El riesgo de la provocación con frutos secos en pacientes sensibilizados a albúminas 2S es alto, sin embargo los datos de este estudio demuestran que en esta situación el riesgo de realizar pruebas de provocación oral controlada con frutos secos distintos a las anacardiáceas sería bajo o nulo. Este hecho es de capital importancia ya que realizar una dieta de exclusión estricta de frutos secos afecta a la calidad de vida de los pacientes porque pueden ser alérgenos ocultos que encontramos en alimentos consumidos frecuentemente como helados, bollería, salsas, etc. Por el contrario, los frutos secos de anacardiáceas (al menos en España) no suelen encontrarse como alérgenos ocultos en estos alimentos.

Por todo ello consideramos que los resultados de esta investigación, aunque con un número reducido de pacientes aportan unos datos importantes con clara transferencia en a la práctica clínica. La reactividad cruzada de las albúminas 2S no ha sido explorada hasta la fecha y es de vital importancia para el manejo de los pacientes alérgicos a frutos secos.

Las albúminas 2S se han caracterizado en estudios previos (252) pero hay pocos estudios moleculares que hayan descrito reactividad cruzada entre alérgenos purificados de albúminas 2S, ej entre Sin a 1 y Bra n 1 (100) o Ara h 2 y Ara h 6 (253). De forma indirecta, se ha descrito reactividad cruzada entre semillas de girasol y entre albúminas 2S de mostaza en un paciente con alergia a mostaza o entre proteínas de 10-12 kDa entre

DISCUSIÓN

sésamo y extracto de semillas de amapola (254) sugiriendo que tanto Ses i 1 o Ses i 2 presentasen reactividad cruzada con la albúmina 2S de la semilla de amapola. Además, Bueno y col., describieron reactividad cruzada entre albúminas 2S de mostaza, sésamo y piñón (255).

En este estudio, se analizó la reactividad IgE detectándose la presencia de bandas de 14 kDa aproximadamente, así como el reconocimiento de albúminas 2S de pistacho y anacardo, confirmando que estos alérgenos están implicados en las reacciones alérgicas presentadas por los pacientes. Las albúminas 2S del pistacho y del anacardo mostraron una identidad de secuencia del 62% y una similitud del 79%.

La reactividad cruzada de las albúminas 2S de pistacho y anacardo se estudió entre sí y luego entre ellas y las albúminas 2S procedentes de otros frutos secos (piñón, avellana o cacahuete) y semillas (semilla de tomate, pipa de girasol y mostaza).

La IgE específica del suero de los pacientes reconocieron las albúminas 2S de pistacho y anacardo, pero no el resto de albúminas 2S de frutos secos o semillas estudiadas, quedando el reconocimiento restringido a las albúminas 2S de las anacardiáceas. También se estudió el grado de reactividad de estas dos proteínas entre sí mediante técnica de inhibición pudiendo comprobar que el anacardo inhibió de una forma importante y significativa, aunque no completa la unión de IgE específica a pistacho, pero al contrario, el pistacho fue capaz de inhibir completamente al anacardo, pudiendo deducir de estos hallazgos que el alérgeno sensibilizante primario sería el pistacho.

Comentario final

Los resultados del estudio multicéntrico en alergia a cacahuete permitieron describir la existencia de tres patrones diferentes de alergia con un patrón dominado por sensibilización a proteínas de reserva en los países anglosajones, PR-10 en centro y norte de Europa y nsLTP en España. La discordancia de los resultados entre los estudios de nuestro grupo (Fundación Jiménez Díaz) con los del Hospital La Paz, permitió describir el predominio de sensibilización a proteínas de reserva en el patrón de la población infantil (101).

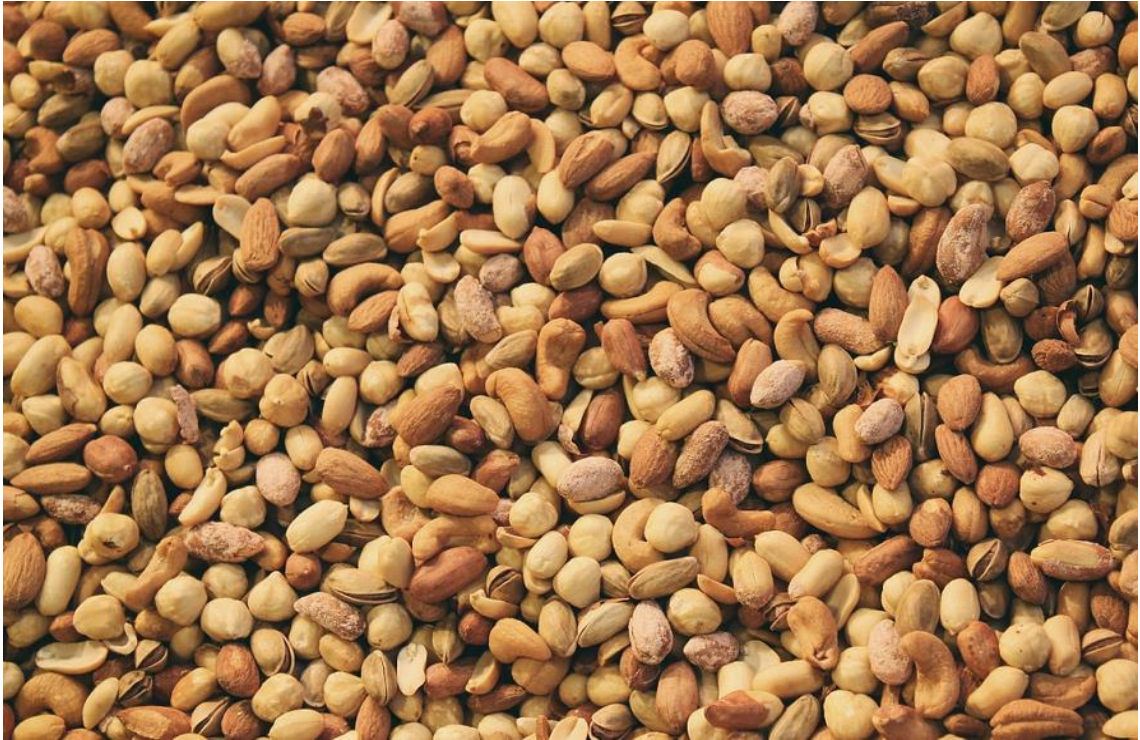
Los resultados de este estudio, junto con otros realizados en España, indican que en nuestro país coexisten tres diferentes patrones de alergia a frutos secos: patrón nsLTP,

DISCUSIÓN

patrón más frecuente en niños mayores de 5 años y en adultos con alergia a frutos secos, patrón Bet v 1, significativo en áreas con pacientes sensibilizados a Bet v 1 por alergia a avellana y finalmente el patrón de proteínas de almacenamiento (albúminas 2S) en niños menores de 5 años con alergia a frutos secos.

A estos patrones moleculares dependientes de la edad tenemos que añadir un nuevo cluster de asociación de alergia a frutos secos que hemos denominado Síndrome Pistacho-Anacardo. Esta nueva entidad se define por presentar alergia exclusiva a pistacho y anacardo con tolerancia al resto de frutos secos, así como ausencia de IgE específica a los mismos. Su base molecular es la sensibilización exclusiva a albúminas 2S de ambos frutos secos con reactividad cruzada entre ellas.

Pensamos que la definición de estos patrones de alergia a frutos secos permitirá optimizar no sólo el diagnóstico sino también el manejo de los pacientes alérgicos en el complejo mundo de la alergia a frutos secos.



6. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los frutos secos que con mayor frecuencia produjeron alergia y, por este orden, en Madrid fueron: la nuez, la avellana, el cacahuete y la almendra.
2. El fruto seco que con mayor frecuencia produjo reacciones sistémicas en Madrid fue la nuez.
3. El patrón molecular predominante en alergia a frutos secos en Madrid fue la LTP, lo cual se reprodujo en cada uno de los frutos secos implicados.
4. Las correlaciones de IgE específica con proteínas purificadas en Madrid fueron superiores para la determinación por técnica de ImmunoCAP que por ISAC.
5. Mediante la determinación de IgE específica se objetivó una alta correlación entre nsLTPs de Ara h 9, Art v 3, Cor a 8, Jug r 3, y Pru p 3. Fue moderada entre estas y Tri a 14 (nsLTP de trigo) y no se detectó con Par j 2 en los pacientes del área de Madrid.
6. La búsqueda de nuevos patrones geográficos puso de manifiesto la existencia de un nuevo patrón molecular en los pacientes de Asturias con un porcentaje repartido entre nsLTPs y proteínas PR-10.
7. Se pudo comprobar que el patrón en Asturias varió dependiendo del fruto seco responsable de la alergia. En este sentido, en alergia a avellana predominó un patrón PR-10, en alergia a cacahuete un patrón nsLTP y en alergia a nuez un patrón mixto.
8. La investigación realizada nos permitió describir la existencia de un nuevo síndrome que denominamos Síndrome pistacho-anacardo. Este síndrome estuvo caracterizado por tener alergia exclusiva a pistacho y anacardo con tolerancia al resto de frutos secos, así como ausencia de IgE específica a los mismos.
9. La base molecular de este síndrome es la sensibilización exclusiva a albúminas 2S de ambos frutos secos con reactividad cruzada entre ellas.

CONCLUSIONES

10. El estudio de la reactividad cruzada entre las distintas albúminas 2S permitió demostrar la escasa o nula reactividad cruzada entre ellas, excepto las pertenecientes a la misma familia taxonómica (*Anacardiaceae*).

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, Jones SM, Sampson HA, Wood RA, et al. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: summary of the NIAID-sponsored expert panel report. *Nutrition research* (New York, NY). 2011;31(1):61-75.
2. Allen KJ. Food allergy: is there a rising prevalence and if so why? *The Medical journal of Australia*. 2011;195(1):5-7.
3. Ojeda P, Sastre J, Olaguibel JM, Chivato T. Alergológica 2015: A National Survey on Allergic Diseases in the Adult Spanish Population. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2018;28(3):151-64.
4. Tan TH, Ellis JA, Saffery R, Allen KJ. The role of genetics and environment in the rise of childhood food allergy. *Clin Exp Allergy*. 2012;42(1):20-9.
5. Vuillermín PJ, Ponsonby AL, Kemp AS, Allen KJ. Potential links between the emerging risk factors for food allergy and vitamin D status. *Clin Exp Allergy*. 2013;43(6):599-607.
6. Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica. *Alergológica. Factores clínicos y epidemiológicos*; 1995.
7. Fernández Rivas M. Food allergy in *Alergológica*-2005. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009;19 Suppl 2:37-44.
8. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. *Annual review of medicine*. 2009;60:261-77.
9. Amlot PL, Kemeny DM, Zachary C, Parkes P, Lessof MH. Oral allergy syndrome (OAS): symptoms of IgE-mediated hypersensitivity to foods. *Clin Allergy*. 1987;17(1):33-42.
10. Ortolani C, Ballmer-Weber BK, Hansen KS, Ispano M, Wuthrich B, Bindslev-Jensen C, et al. Hazelnut allergy: a double-blind, placebo-controlled food challenge multicenter study. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;105(3):577-81.
11. Comité de Reacciones Adversas a Alimentos. Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica. *Metodología diagnóstica en alergia a alimentos*. *Alergol Inmunol Clin*. 1999;14:50-62.
12. Breiteneder H, Radauer C. A classification of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113(5):821-30; quiz 31.
13. Shewry PR, Lucas JA. Plant Proteins that Confer Resistance to Pests and Pathogens. In: Callow JA, editor. *Advances in Botanical Research*. 26: Academic Press; 1997. p. 135-92.
14. Van Loon LC, Van Strien EA. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 1999;55(2):85-97.
15. Breiteneder H, Mills EN. Molecular properties of food allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(1):14-23; quiz 4.

BIBLIOGRAFÍA

16. Markovic-Housley Z, Degano M, Lamba D, von Roepenack-Lahaye E, Clemens S, Susani M, et al. Crystal structure of a hypoallergenic isoform of the major birch pollen allergen Bet v 1 and its likely biological function as a plant steroid carrier. *Journal of molecular biology*. 2003;325(1):123-33.
17. Vieths S, Scheurer S, Ballmer-Weber B. Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002;964:47-68.
18. van Ree R. Clinical importance of cross-reactivity in food allergy. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2004;4(3):235-40.
19. Hauser M, Asam C, Himly M, Palazzo P, Voltolini S, Montanari C, et al. Bet v 1-like pollen allergens of multiple Fagales species can sensitize atopic individuals. *Clin Exp Allergy*. 2011;41(12):1804-14.
20. Geroldinger-Simic M, Zelniker T, Aberer W, Ebner C, Egger C, Greiderer A, et al. Birch pollen-related food allergy: clinical aspects and the role of allergen-specific IgE and IgG4 antibodies. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(3):616-22.e1.
21. Kleine-Tebbe J, Vogel L, Crowell DN, Haustein UF, Vieths S. Severe oral allergy syndrome and anaphylactic reactions caused by a Bet v 1-related PR-10 protein in soybean, SAM22. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110(5):797-804.
22. Schimek EM, Zwolfer B, Briza P, Jahn-Schmid B, Vogel L, Vieths S, et al. Gastrointestinal digestion of Bet v 1-homologous food allergens destroys their mediator-releasing, but not T cell-activating, capacity. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116(6):1327-33.
23. Lleónart R, Cistero A, Carreira J, Batista A, Moscoso del Prado J. Food allergy: identification of the major IgE-binding component of peach (*Prunus persica*). *Annals of allergy*. 1992;69(2):128-30.
24. Sanchez-Monge R, Lombardero M, Garcia-Selles FJ, Barber D, Salcedo G. Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;103(3 Pt 1):514-9.
25. Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Ortolani C, Ispano M, Monza M, et al. The major allergen of peach (*Prunus persica*) is a lipid transfer protein. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;103(3 Pt 1):520-6.
26. Salcedo G, Sanchez-Monge R, Barber D, Diaz-Perales A. Plant non-specific lipid transfer proteins: an interface between plant defence and human allergy. *Biochimica et biophysica acta*. 2007;1771(6):781-91.
27. Kader JC. LIPID-TRANSFER PROTEINS IN PLANTS. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*. 1996;47:627-54.
28. Garcia BE, Lombardero M, Echechipia S, Olaguibel JM, Diaz-Perales A, Sanchez-Monge R, et al. Respiratory allergy to peach leaves and lipid-transfer proteins. *Clin Exp Allergy*. 2004;34(2):291-5.

BIBLIOGRAFÍA

29. Barber D, de la Torre F, Lombardero M, Antepara I, Colas C, Davila I, et al. Component-resolved diagnosis of pollen allergy based on skin testing with profilin, polcalcin and lipid transfer protein pan-allergens. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(11):1764-73.
30. Carnes J, Fernandez-Caldas E, Gallego MT, Ferrer A, Cuesta-Herranz J. Pru p 3 (LTP) content in peach extracts. *Allergy*. 2002;57(11):1071-5.
31. Fernandez-Rivas M, Bolhaar S, Gonzalez-Mancebo E, Asero R, van Leeuwen A, Bohle B, et al. Apple allergy across Europe: how allergen sensitization profiles determine the clinical expression of allergies to plant foods. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118(2):481-8.
32. Gaier S, Oberhuber C, Hemmer W, Radauer C, Rigby NM, Marsh JT, et al. Pru p 3 as a marker for symptom severity for patients with peach allergy in a birch pollen environment. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(1):166-7.
33. Crespo JF, Rodriguez J, James JM, Daroca P, Reano M, Vives R. Reactivity to potential cross-reactive foods in fruit-allergic patients: implications for prescribing food avoidance. *Allergy*. 2002;57(10):946-9.
34. Diaz-Perales A, Lombardero M, Sanchez-Monge R, Garcia-Selles FJ, Pernas M, Fernandez-Rivas M, et al. Lipid-transfer proteins as potential plant panallergens: cross-reactivity among proteins of *Artemisia* pollen, *Castanea* nut and *Rosaceae* fruits, with different IgE-binding capacities. *Clin Exp Allergy*. 2000;30(10):1403-10.
35. Pastorello EA, Vieths S, Pravettoni V, Farioli L, Trambaioli C, Fortunato D, et al. Identification of hazelnut major allergens in sensitive patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;109(3):563-70.
36. Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Robino AM, Scibilia J, Fortunato D, et al. Lipid transfer protein and vicilin are important walnut allergens in patients not allergic to pollen. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114(4):908-14.
37. Krause S, Reese G, Randow S, Zennaro D, Quarantino D, Palazzo P, et al. Lipid transfer protein (Ara h 9) as a new peanut allergen relevant for a Mediterranean allergic population. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(4):771-8.e5.
38. Akkerdaas J, Finkina EI, Balandin SV, Santos Magadan S, Knulst A, Fernandez-Rivas M, et al. Lentil (*Lens culinaris*) lipid transfer protein Len c 3: a novel legume allergen. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012;157(1):51-7.
39. Kulkarni A, Ananthanarayan L, Raman K. Identification of putative and potential cross-reactive chickpea (*Cicer arietinum*) allergens through an in silico approach. *Computational biology and chemistry*. 2013;47:149-55.
40. Zoccatelli G, Pokoj S, Foetisch K, Bartra J, Valero A, Del Mar San Miguel-Moncin M, et al. Identification and characterization of the major allergen of green bean (*Phaseolus vulgaris*) as a non-specific lipid transfer protein (Pha v 3). *Molecular immunology*. 2010;47(7-8):1561-8.

BIBLIOGRAFÍA

41. Bernardi ML, Giangrieco I, Camardella L, Ferrara R, Palazzo P, Panico MR, et al. Allergenic lipid transfer proteins from plant-derived foods do not immunologically and clinically behave homogeneously: the kiwifruit LTP as a model. *PLoS One*. 2011;6(11):e27856.
42. Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Ortolani C, Fortunato D, Giuffrida MG, et al. Identification of grape and wine allergens as an endochitinase 4, a lipid-transfer protein, and a thaumatin. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(2):350-9.
43. Ahrazem O, Ibanez MD, Lopez-Torreon G, Sanchez-Monge R, Sastre J, Lombardero M, et al. Orange germin-like glycoprotein Cit s 1: an equivocal allergen. *Int Arch Allergy Immunol*. 2006;139(2):96-103.
44. San Miguel-Moncin M, Krail M, Scheurer S, Enrique E, Alonso R, Conti A, et al. Lettuce anaphylaxis: identification of a lipid transfer protein as the major allergen. *Allergy*. 2003;58(6):511-7.
45. Diaz-Perales A, Tabar AI, Sanchez-Monge R, Garcia BE, Gomez B, Barber D, et al. Characterization of asparagus allergens: a relevant role of lipid transfer proteins. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110(5):790-6.
46. Lopez-Matas MA, Larramendi CH, Ferrer A, Huertas AJ, Pagan JA, Garcia-Abujeta JL, et al. Identification and quantification of tomato allergens: in vitro characterization of six different varieties. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2011;106(3):230-8.
47. Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Ispano M, Scibola E, Trambaioli C, et al. The maize major allergen, which is responsible for food-induced allergic reactions, is a lipid transfer protein. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106(4):744-51.
48. Beezhold DH, Hickey VL, Kostyal DA, Puhl H, Zuidmeer L, van Ree R, et al. Lipid transfer protein from *Hevea brasiliensis* (Hev b 12), a cross-reactive latex protein. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2003;90(4):439-45.
49. Garcia-Selles FJ, Diaz-Perales A, Sanchez-Monge R, Alcantara M, Lombardero M, Barber D, et al. Patterns of reactivity to lipid transfer proteins of plant foods and *Artemisia* pollen: an in vivo study. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;128(2):115-22.
50. Palacin A, Gomez-Casado C, Rivas LA, Aguirre J, Tordesillas L, Bartra J, et al. Graph based study of allergen cross-reactivity of plant lipid transfer proteins (LTPs) using microarray in a multicenter study. *PLoS One*. 2012;7(12):e50799.
51. Barber D, de la Torre F, Feo F, Florido F, Guardia P, Moreno C, et al. Understanding patient sensitization profiles in complex pollen areas: a molecular epidemiological study. *Allergy*. 2008;63(11):1550-8.
52. Brehler R, Theissen U, Mohr C, Luger T. "Latex-fruit syndrome": frequency of cross-reacting IgE antibodies. *Allergy*. 1997;52(4):404-10.
53. Blanco C. Latex-fruit syndrome. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2003;3(1):47-53.

BIBLIOGRAFÍA

54. Palacin A, Rivas LA, Gomez-Casado C, Aguirre J, Tordesillas L, Bartra J, et al. The involvement of thaumatin-like proteins in plant food cross-reactivity: a multicenter study using a specific protein microarray. *PLoS One*. 2012;7(9):e44088.
55. Azofra Garcia J, Cuesta-Herranz J, Perea Lam N, Diaz-Perales A. Anaphylaxis mediated by thaumatin-like proteins. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2014;24(6):448-9.
56. Hsieh LS, Moos M, Jr., Lin Y. Characterization of apple 18 and 31 kd allergens by microsequencing and evaluation of their content during storage and ripening. *J Allergy Clin Immunol*. 1995;96(6 Pt 1):960-70.
57. Palacin A, Tordesillas L, Gamboa P, Sanchez-Monge R, Cuesta-Herranz J, Sanz ML, et al. Characterization of peach thaumatin-like proteins and their identification as major peach allergens. *Clin Exp Allergy*. 2010;40(9):1422-30.
58. Inschlag C, Hoffmann-Sommergruber K, O'Riordain G, Ahorn H, Ebner C, Scheiner O, et al. Biochemical characterization of Pru a 2, a 23-kD thaumatin-like protein representing a potential major allergen in cherry (*Prunus avium*). *Int Arch Allergy Immunol*. 1998;116(1):22-8.
59. Jensen-Jarolim E, Santner B, Leitner A, Grimm R, Scheiner O, Ebner C, et al. Bell peppers (*Capsicum annuum*) express allergens (profilin, pathogenesis-related protein P23 and Bet v 1) depending on the horticultural strain. *Int Arch Allergy Immunol*. 1998;116(2):103-9.
60. Gavrovic-Jankulovic M, cIrkovic T, Vuckovic O, Atanaskovic-Markovic M, Petersen A, Gojgic G, et al. Isolation and biochemical characterization of a thaumatin-like kiwi allergen. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110(5):805-10.
61. Garrido-Arandia M, Murua-Garcia A, Palacin A, Tordesillas L, Gomez-Casado C, Blanca-Lopez N, et al. The role of N-glycosylation in kiwi allergy. *Food science & nutrition*. 2014;2(3):260-71.
62. Palacin A, Rodriguez J, Blanco C, Lopez-Torreon G, Sanchez-Monge R, Varela J, et al. Immunoglobulin E recognition patterns to purified Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) allergens in patients sensitized to Kiwi with different clinical symptoms. *Clin Exp Allergy*. 2008;38(7):1220-8.
63. Palacin A, Quirce S, Sanchez-Monge R, Bobolea I, Diaz-Perales A, Martin-Munoz F, et al. Sensitization profiles to purified plant food allergens among pediatric patients with allergy to banana. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2011;22(2):186-95.
64. Gandolfo-Cano M, Gonzalez-Mancebo E, Gonzalez-de-Olano D, Mohedano-Vicente E, Munoz-Garcia E, Bartolome B, et al. Lipid transfer proteins and thaumatins as relevant allergens in melon peel allergy. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2012;109(3):224-5.
65. Lehto M, Airaksinen L, Puustinen A, Tillander S, Hannula S, Nyman T, et al. Thaumatin-like protein and baker's respiratory allergy. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2010;104(2):139-46.

BIBLIOGRAFÍA

66. Ashok Kumar HG, Hegde VL, Shetty SM, Venkatesh YP. Characterization and gene cloning of an acidic thaumatin-like protein (TLP 1), an allergen from sapodilla fruit (*Manilkara zapota*). *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*. 2013;62(4):447-62.
67. Munoz-Garcia E, Luengo-Sanchez O, Haroun-Diaz E, Maroto AS, Palacin A, Diaz-Perales A, et al. Identification of thaumatin-like protein and aspartyl protease as new major allergens in lettuce (*Lactuca sativa*). *Molecular nutrition & food research*. 2013;57(12):2245-52.
68. Larramendi CH, Lopez-Matas MA, Ferrer A, Huertas AJ, Pagan JA, Navarro LA, et al. Prevalence of sensitization to *Cannabis sativa*. Lipid-transfer and thaumatin-like proteins are relevant allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013;162(2):115-22.
69. Fedorov AA, Ball T, Mahoney NM, Valenta R, Almo SC. The molecular basis for allergen cross-reactivity: crystal structure and IgE-epitope mapping of birch pollen profilin. *Structure*. 1997;5(1):33-45.
70. Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Amato S, Zanoni D, Barocci F, et al. Detection of clinical markers of sensitization to profilin in patients allergic to plant-derived foods. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112(2):427-32.
71. Fah J, Wuthrich B, Vieths S. Anaphylactic reaction to lychee fruit: evidence for sensitization to profilin. *Clin Exp Allergy*. 1995;25(10):1018-23.
72. Sanchez-Salguero CA. Are profilins relevant allergens or confusion allergens? *Allergologia et immunopathologia*. 2014;42(4):267-8.
73. Cuesta-Herranz J, Barber D, Blanco C, Cistero-Bahima A, Crespo JF, Fernandez-Rivas M, et al. Differences among pollen-allergic patients with and without plant food allergy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;153(2):182-92.
74. Tzen J, Cao Y, Laurent P, Ratnayake C, Huang A. Lipids, Proteins, and Structure of Seed Oil Bodies from Diverse Species. *Plant Physiol*. 1993;101(1):267-76.
75. Huang MD, Huang AH. Bioinformatics Reveal Five Lineages of Oleosins and the Mechanism of Lineage Evolution Related to Structure/Function from Green Algae to Seed Plants. *Plant Physiol*. 2015;169(1):453-70.
76. Frandsen GI, Mundy J, Tzen JT. Oil bodies and their associated proteins, oleosin and caleosin. *Physiol Plant*. 2001;112(3):301-7.
77. Li M, Smith LJ, Clark DC, Wilson R, Murphy DJ. Secondary structures of a new class of lipid body proteins from oilseeds. *J Biol Chem*. 1992;267(12):8245-53.
78. Schwager C, Kull S, Krause S, Schocker F, Petersen A, Becker WM, et al. Development of a novel strategy to isolate lipophilic allergens (oleosins) from peanuts. *PLoS One*. 2015;10(4):e0123419.
79. Pons L, Chery C, Romano A, Namour F, Artesani MC, Gueant JL. The 18 kDa peanut oleosin is a candidate allergen for IgE-mediated reactions to peanuts. *Allergy*. 2002;57 Suppl 72:88-93.

BIBLIOGRAFÍA

80. Schwager C, Kull S, Behrends J, Rockendorf N, Schocker F, Frey A, et al. Peanut oleosins associated with severe peanut allergy-importance of lipophilic allergens for comprehensive allergy diagnostics. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140(5):1331-8 e8.
81. Zuidmeer-Jongejan L, Fernandez-Rivas M, Winter MG, Akkerdaas JH, Summers C, Lebens A, et al. Oil body-associated hazelnut allergens including oleosins are underrepresented in diagnostic extracts but associated with severe symptoms. *Clin Transl Allergy.* 2014;4(1):4.
82. Montoro J, Domenech J, Pineda F, Cerdà V J. Oral Allergy Syndrome Due to Nut Oleosins 2015. 301-2 p.
83. Macias ML, Gómez F, Diaz A, Mayorga C, Aranda A, González M, et al. Basophil Response To Storage Proteins and Oleosins From Sunflower Seed. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 133(2):AB111.
84. Leduc V, Moneret-Vautrin DA, Tzen JT, Morisset M, Guerin L, Kanny G. Identification of oleosins as major allergens in sesame seed allergic patients. *Allergy.* 2006;61(3):349-56.
85. Armentia A, Pineda F, Martin B, San Miguel A, Martin Gil FJ, Puente Y, et al. Anaphylaxis caused by hidden soybean allergens in pillows. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131(1):228-30.
86. Hyun TK, Kumar D, Cho YY, Hyun HN, Kim JS. Computational identification and phylogenetic analysis of the oil-body structural proteins, oleosin and caleosin, in castor bean and flax. *Gene.* 2013;515(2):454-60.
87. Jappe U, Schwager C. Relevance of Lipophilic Allergens in Food Allergy Diagnosis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2017;17(9):61.
88. Apostolovic D, Stanic-Vucinic D, de Jongh HH, de Jong GA, Mihailovic J, Radosavljevic J, et al. Conformational stability of digestion-resistant peptides of peanut conglutins reveals the molecular basis of their allergenicity. *Scientific reports.* 2016;6:29249.
89. Mills EN, Jenkins J, Marigheto N, Belton PS, Gunning AP, Morris VJ. Allergens of the cupin superfamily. *Biochemical Society transactions.* 2002;30(Pt 6):925-9.
90. Maleki SJ, Chung SY, Champagne ET, Raufman JP. The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106(4):763-8.
91. Dunwell JM, Culham A, Carter CE, Sosa-Aguirre CR, Goodenough PW. Evolution of functional diversity in the cupin superfamily. *Trends Biochem Sci.* 2001;26(12):740-6.
92. Dunwell JM. Cupins: a new superfamily of functionally diverse proteins that include germins and plant storage proteins. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 1998;15:1-32.
93. Jensen-Jarolim E, Schmid B, Bernier F, Berna A, Kinaciyan T, Focke M, et al. Allergologic exploration of germins and germin-like proteins, a new class of plant allergens. *Allergy.* 2002;57(9):805-10.
94. Serra IA, Bernardo L, Spadafora A, Faccioli P, Canton C, Mazzuca S. The Citrus clementina putative allergens: from proteomic analysis to structural features. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2013;61(37):8949-58.

BIBLIOGRAFÍA

95. Leitner A, Jensen-Jarolim E, Grimm R, Wuthrich B, Ebner H, Scheiner O, et al. Allergens in pepper and paprika. Immunologic investigation of the celery-birch-mugwort-spice syndrome. *Allergy*. 1998;53(1):36-41.
96. Palosuo K. Update on wheat hypersensitivity. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2003;3(3):205-9.
97. Quirce S, Diaz-Perales A. Diagnosis and management of grain-induced asthma. *Allergy, asthma & immunology research*. 2013;5(6):348-56.
98. Bittner C, Grassau B, Frenzel K, Baur X. Identification of wheat gliadins as an allergen family related to baker's asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121(3):744-9.
99. Pastorello EA, Pompei C, Pravettoni V, Brenna O, Farioli L, Trambaioli C, et al. Lipid transfer proteins and 2S albumins as allergens. *Allergy*. 2001;56 Suppl 67:45-7.
100. Monsalve RI, Gonzalez de la Pena MA, Lopez-Otin C, Fiandor A, Fernandez C, Villalba M, et al. Detection, isolation and complete amino acid sequence of an aeroallergenic protein from rapeseed flour. *Clin Exp Allergy*. 1997;27(7):833-41.
101. Garcia-Blanca A, Aranda A, Blanca-Lopez N, Perez D, Gomez F, Mayorga C, et al. Influence of age on IgE response in peanut-allergic children and adolescents from the Mediterranean area. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2015;26(6):497-502.
102. Bonds RS, Midoro-Horiuti T, Goldblum R. A structural basis for food allergy: the role of cross-reactivity. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2008;8(1):82-6.
103. Garcia BE, Lizaso MT. Cross-reactivity syndromes in food allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2011;21(3):162-70; quiz 2 p following 70.
104. Joint Fao/Who Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology RJ, Fao RA, Economic Development Analysis Div. Who G. Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report. 2001.
105. Hilger C, Thill L, Grigioni F, Lehnert C, Falagiani P, Ferrara A, et al. IgE antibodies of fish allergic patients cross-react with frog parvalbumin. *Allergy*. 2004;59(6):653-60.
106. Fernandez-Rivas M, van Ree R, Cuevas M. Allergy to Rosaceae fruits without related pollinosis. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;100(6 Pt 1):728-33.
107. Cuesta-Herranz J, Lazaro M, Figueredo E, Igea JM, Umpierrez A, De-Las-Heras M. Allergy to plant-derived fresh foods in a birch- and ragweed-free area. *Clin Exp Allergy*. 2000;30(10):1411-6.
108. Rodriguez J, Crespo JF, Lopez-Rubio A, De La Cruz-Bertolo J, Ferrando-Vivas P, Vives R, et al. Clinical cross-reactivity among foods of the Rosaceae family. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106(1 Pt 1):183-9.
109. Bohle B. The impact of pollen-related food allergens on pollen allergy. *Allergy*. 2007;62(1):3-10.

BIBLIOGRAFÍA

110. Sicherer SH. Epidemiology of food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(3):594-602.
111. Eriksson NE, Formgren H, Svenonius E. Food hypersensitivity in patients with pollen allergy. *Allergy*. 1982;37(6):437-43.
112. Pastorello EA, Incorvaia C, Pravettoni V, Farioli L, Conti A, Vigano G, et al. New allergens in fruits and vegetables. *Allergy*. 1998;53(46 Suppl):48-51.
113. Valenta R, Kraft D. Type 1 allergic reactions to plant-derived food: a consequence of primary sensitization to pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 1996;97(4):893-5.
114. Berneder M, Bublin M, Hoffmann-Sommergruber K, Hawranek T, Lang R. Allergen chip diagnosis for soy-allergic patients: Gly m 4 as a marker for severe food-allergic reactions to soy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013;161(3):229-33.
115. Bolhaar ST, van Ree R, Ma Y, Bruijnzeel-Koomen CA, Vieths S, Hoffmann-Sommergruber K, et al. Severe allergy to sharon fruit caused by birch pollen. *Int Arch Allergy Immunol*. 2005;136(1):45-52.
116. Bolhaar ST, Ree R, Bruijnzeel-Koomen CA, Knulst AC, Zuidmeer L. Allergy to jackfruit: a novel example of Bet v 1-related food allergy. *Allergy*. 2004;59(11):1187-92.
117. Ballmer-Weber BK, Vieths S, Luttkopf D, Heuschmann P, Wuthrich B. Celery allergy confirmed by double-blind, placebo-controlled food challenge: a clinical study in 32 subjects with a history of adverse reactions to celery root. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106(2):373-8.
118. Ballmer-Weber BK, Wuthrich B, Wangorsch A, Fotisch K, Altmann F, Vieths S. Carrot allergy: double-blinded, placebo-controlled food challenge and identification of allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108(2):301-7.
119. Andersson K, Lidholm J. Characteristics and immunobiology of grass pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. 2003;130(2):87-107.
120. Mari A, Ooievaar-de Heer P, Scala E, Giani M, Pirrotta L, Zuidmeer L, et al. Evaluation by double-blind placebo-controlled oral challenge of the clinical relevance of IgE antibodies against plant glycans. *Allergy*. 2008;63(7):891-6.
121. Azofra J, Berroa F, Gastaminza G, Saiz N, Gamboa PM, Vela C, et al. Lipid Transfer Protein Syndrome in a Non-Mediterranean Area. *Int Arch Allergy Immunol*. 2016;169(3):181-8.
122. Werfel T, Asero R, Ballmer-Weber BK, Beyer K, Enrique E, Knulst AC, et al. Position paper of the EAACI: food allergy due to immunological cross-reactions with common inhalant allergens. *Allergy*. 2015;70(9):1079-90.
123. Kivity S, Dunner K, Marian Y. The pattern of food hypersensitivity in patients with onset after 10 years of age. *Clin Exp Allergy*. 1994;24(1):19-22.

BIBLIOGRAFÍA

124. Fernandez-Rivas M, Gonzalez-Mancebo E, Rodriguez-Perez R, Benito C, Sanchez-Monge R, Salcedo G, et al. Clinically relevant peach allergy is related to peach lipid transfer protein, Pru p 3, in the Spanish population. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112(4):789-95.
125. Gamboa PM, Caceres O, Antepara I, Sanchez-Monge R, Ahrazem O, Salcedo G, et al. Two different profiles of peach allergy in the north of Spain. *Allergy.* 2007;62(4):408-14.
126. Hansen KS, Ballmer-Weber BK, Sastre J, Lidholm J, Andersson K, Oberhofer H, et al. Component-resolved in vitro diagnosis of hazelnut allergy in Europe. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123(5):1134-41, 41 e1-3.
127. Burks AW, Sampson HA, Plaut M, Lack G, Akdis CA. Treatment for food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(1):1-9.
128. Geiselhart S, Hoffmann-Sommergruber K, Bublin M. Tree nut allergens. *Molecular immunology.* 2018;100:71-81.
129. Allen KJ, Hill DJ, Heine RG. 4. Food allergy in childhood. *The Medical journal of Australia.* 2006;185(7):394-400.
130. Shah E, Pongratic J. Food-induced anaphylaxis: who, what, why, and where? *Pediatric annals.* 2008;37(8):536-41.
131. McWilliam V, Koplin J, Lodge C, Tang M, Dharmage S, Allen K. The Prevalence of Tree Nut Allergy: A Systematic Review. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2015;15(9):54.
132. Clark AT, Ewan PW. The development and progression of allergy to multiple nuts at different ages. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology.* 2005;16(6):507-11.
133. Sathe SK, Wolf WJ, Roux KH, Teuber SS, Venkatachalam M, Sze-Tao KW. Biochemical characterization of amandin, the major storage protein in almond (*Prunus dulcis* L.). *Journal of agricultural and food chemistry.* 2002;50(15):4333-41.
134. Roux KH, Teuber SS, Robotham JM, Sathe SK. Detection and stability of the major almond allergen in foods. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2001;49(5):2131-6.
135. de Leon MP, Glaspole IN, Drew AC, Rolland JM, O'Hehir RE, Suphioglu C. Immunological analysis of allergenic cross-reactivity between peanut and tree nuts. *Clin Exp Allergy.* 2003;33(9):1273-80.
136. Ano MA, Maselli JP, Sanz ML, Fernandez-Benitez M. Allergy to pine nut. *Allergologia et immunopathologia.* 2002;30(2):104-8.
137. Conti A, Fortunato D, Ortolani C, Giuffrida MG, Pravettoni V, Napolitano L, et al. Determination of the primary structure of two lipid transfer proteins from apricot (*Prunus armeniaca*). *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications.* 2001;756(1-2):123-9.

BIBLIOGRAFÍA

138. Tawde P, Venkatesh YP, Wang F, Teuber SS, Sathe SK, Roux KH. Cloning and characterization of profilin (Pru du 4), a cross-reactive almond (*Prunus dulcis*) allergen. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118(4):915-22.
139. Eller E, Mortz CG, Bindslev-Jensen C. Cor a 14 is the superior serological marker for hazelnut allergy in children, independent of concomitant peanut allergy. *Allergy*. 2016;71(4):556-62.
140. Beyer K, Grishina G, Bardina L, Grishin A, Sampson HA. Identification of an 11S globulin as a major hazelnut food allergen in hazelnut-induced systemic reactions. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110(3):517-23.
141. Hansen KS, Ballmer-Weber BK, Sastre J, Lidholm J, Andersson K, Oberhofer H, et al. Component-resolved in vitro diagnosis of hazelnut allergy in Europe. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123(5):1134-41, 41.e1-3.
142. Lauer I, Foetisch K, Kolarich D, Ballmer-Weber BK, Conti A, Altmann F, et al. Hazelnut (*Corylus avellana*) vicilin Cor a 11: molecular characterization of a glycoprotein and its allergenic activity. *Biochem J*. 2004;383(Pt 2):327-34.
143. Cabanillas B, Novak N. Allergic Reactions to Pine Nut: A Review. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2015;25(5):329-33.
144. Cabanillas B, Cheng H, Grimm CC, Hurlburt BK, Rodriguez J, Crespo JF, et al. Pine nut allergy: clinical features and major allergens characterization. *Molecular nutrition & food research*. 2012;56(12):1884-93.
145. Garcia-Menaya JM, Gonzalo-Garijo MA, Moneo I, Fernandez B, Garcia-Gonzalez F, Moreno F. A 17-kDa allergen detected in pine nuts. *Allergy*. 2000;55(3):291-3.
146. Ibanez MD, Lombardero M, San Ireneo MM, Munoz MC. Anaphylaxis induced by pine nuts in two young girls. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2003;14(4):317-9.
147. Barbarroja-Escudero J, Antolin-Amerigo D, Sanchez-Gonzalez MJ, Rodriguez-Rodriguez M, Ledesma-Fernandez A, Alvarez-Mon M. Pine nut anaphylaxis: a proteomic study. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*. 2014;63(1):125-6.
148. Asero R, Bresciani M, Cervone M, Minale P, Murzilli F, Quercia O, et al. Analysis of the IgE response to pine nut allergens in Italian allergic patients. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2014;24(3):204-6.
149. Sicherer SH, Furlong TJ, Munoz-Furlong A, Burks AW, Sampson HA. A voluntary registry for peanut and tree nut allergy: characteristics of the first 5149 registrants. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108(1):128-32.
150. Liccardi G, Mistrello G, Noschese P, Falagiani P, D'Amato M, D'Amato G. Oral allergy syndrome (OAS) in pollinosis patients after eating pistachio nuts: two cases with two different patterns of onset. *Allergy*. 1996;51(12):919-22.

BIBLIOGRAFÍA

151. Ando K, Watanabe D, Tamada Y, Matsumoto Y. Oral allergy syndrome with severe anaphylaxis induced by pistachio. *International journal of dermatology*. 2011;50(5):632-3.
152. Fernandez C, Fiandor A, Martinez-Garate A, Martinez Quesada J. Allergy to pistachio: crossreactivity between pistachio nut and other Anacardiaceae. *Clin Exp Allergy*. 1995;25(12):1254-9.
153. Ahn K, Bardina L, Grishina G, Beyer K, Sampson HA. Identification of two pistachio allergens, Pis v 1 and Pis v 2, belonging to the 2S albumin and 11S globulin family. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(6):926-34.
154. Willison LN, Tawde P, Robotham JM, Penney RMt, Teuber SS, Sathe SK, et al. Pistachio vicilin, Pis v 3, is immunoglobulin E-reactive and cross-reacts with the homologous cashew allergen, Ana o 1. *Clin Exp Allergy*. 2008;38(7):1229-38.
155. Ayuso R, Grishina G, Ahn K, Bardina L, Beyer K, Sampson H. Identification of a MnSOD-like Protein as a New Major Pistachio Allergen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 119(1):S115.
156. Noorbakhsh R, Mortazavi SA, Sankian M, Shahidi F, Assarehzadegan MA, Varasteh A. Cloning, expression, characterization, and computational approach for cross-reactivity prediction of manganese superoxide dismutase allergen from pistachio nut. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*. 2010;59(3):295-304.
157. Marks JG, Jr., DeMelfi T, McCarthy MA, Witte EJ, Castagnoli N, Epstein WL, et al. Dermatitis from cashew nuts. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1984;10(4):627-31.
158. Burks AW, James JM, Hiegel A, Wilson G, Wheeler JG, Jones SM, et al. Atopic dermatitis and food hypersensitivity reactions. *The Journal of pediatrics*. 1998;132(1):132-6.
159. Tariq SM, Stevens M, Matthews S, Ridout S, Twiselton R, Hide DW. Cohort study of peanut and tree nut sensitisation by age of 4 years. *BMJ (Clinical research ed)*. 1996;313(7056):514-7.
160. Wang F, Robotham JM, Teuber SS, Tawde P, Sathe SK, Roux KH. Ana o 1, a cashew (*Anacardium occidentale*) allergen of the vicilin seed storage protein family. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110(1):160-6.
161. Wang F, Robotham JM, Teuber SS, Sathe SK, Roux KH. Ana o 2, a major cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut allergen of the legumin family. *Int Arch Allergy Immunol*. 2003;132(1):27-39.
162. Robotham JM, Wang F, Seamon V, Teuber SS, Sathe SK, Sampson HA, et al. Ana o 3, an important cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) allergen of the 2S albumin family. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(6):1284-90.
163. Savvatanos S, Konstantinopoulos AP, Borga A, Stavroulakis G, Lidholm J, Borres MP, et al. Sensitization to cashew nut 2S albumin, Ana o 3, is highly predictive of cashew and pistachio allergy in Greek children. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(1):192-4.

BIBLIOGRAFÍA

164. Vetander M, Helander D, Flodstrom C, Ostblom E, Alfven T, Ly DH, et al. Anaphylaxis and reactions to foods in children--a population-based case study of emergency department visits. *Clin Exp Allergy*. 2012;42(4):568-77.
165. Garcia Ortiz JC, Cosmes PM, Lopez-Asunsolo A. Allergy to foods in patients monosensitized to *Artemisia* pollen. *Allergy*. 1996;51(12):927-31.
166. Lee SK, Yoon SH, Kim SH, Choi JH, Park HS. Chestnut as a food allergen: identification of major allergens. *J Korean Med Sci*. 2005;20(4):573-8.
167. Blanco C, Carrillo T, Castillo R, Quiralte J, Cuevas M. Latex allergy: clinical features and cross-reactivity with fruits. *Annals of allergy*. 1994;73(4):309-14.
168. Rihs HP, Chen Z, Rozynek P, Baur X, Lundberg M, Cremer R. PCR-based cloning, isolation, and IgE-binding properties of recombinant latex profilin (rHev b 8). *Allergy*. 2000;55(8):712-7.
169. Sanchez-Monge R, Blanco C, Lopez-Torreon G, Cumplido J, Recas M, Figueroa J, et al. Differential allergen sensitization patterns in chestnut allergy with or without associated latex-fruit syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118(3):705-10.
170. Kelly JD, Hefle SL. 2S methionine-rich protein (SSA) from sunflower seed is an IgE-binding protein. *Allergy*. 2000;55(6):556-60.
171. Yagami A. Anaphylaxis to lipid transfer protein from sunflower seeds. *Allergy*. 2010;65(10):1340-1.
172. Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Amato S. Allergenic similarities of 2S albumins. *Allergy*. 2002;57(1):62-3.
173. Kortt AA, Caldwell JB, Lilley GG, Higgins TJ. Amino acid and cDNA sequences of a methionine-rich 2S protein from sunflower seed (*Helianthus annuus* L.). *Eur J Biochem*. 1991;195(2):329-34.
174. Lavine E, Ben-Shoshan M. Allergy to sunflower seed and sunflower butter as proposed vehicle for sensitization. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2015;11(1):2.
175. Ros E. Health benefits of nut consumption. *Nutrients*. 2010;2(7):652-82.
176. Wallowitz M, Peterson WR, Uratsu S, Comstock SS, Dandekar AM, Teuber SS. Jug r 4, a legumin group food allergen from walnut (*Juglans regia* Cv. Chandler). *Journal of agricultural and food chemistry*. 2006;54(21):8369-75.
177. Teuber SS, Dandekar AM, Peterson WR, Sellers CL. Cloning and sequencing of a gene encoding a 2S albumin seed storage protein precursor from English walnut (*Juglans regia*), a major food allergen. *J Allergy Clin Immunol*. 1998;101(6 Pt 1):807-14.
178. Teuber SS, Jarvis KC, Dandekar AM, Peterson WR, Ansari AA. Identification and cloning of a complementary DNA encoding a vicilin-like proprotein, jug r 2, from english walnut kernel (*Juglans regia*), a major food allergen. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104(6):1311-20.

BIBLIOGRAFÍA

179. Sato S, Yamamoto M, Yanagida N, Ito K, Ohya Y, Imai T, et al. Jug r 1 sensitization is important in walnut-allergic children and youth. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2017;5(6):1784-6 e1.
180. Poltronieri P, Cappello MS, Dohmae N, Conti A, Fortunato D, Pastorello EA, et al. Identification and characterisation of the IgE-binding proteins 2S albumin and conglutin gamma in almond (*Prunus dulcis*) seeds. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002;128(2):97-104.
181. Roux KH, Teuber SS, Sathe SK. Tree nut allergens. *Int Arch Allergy Immunol.* 2003;131(4):234-44.
182. Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Amato S, Caldironi G, Barocci F, et al. Immunological cross-reactivity between lipid transfer proteins from botanically unrelated plant-derived foods: a clinical study. *Allergy.* 2002;57(10):900-6.
183. Fries JH. Peanuts: allergic and other untoward reactions. *Annals of allergy.* 1982;48(4):220-6.
184. Beyer K, Morrow E, Li XM, Bardina L, Bannon GA, Burks AW, et al. Effects of cooking methods on peanut allergenicity. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;107(6):1077-81.
185. de Jong EC, Van Zijverden M, Spanhaak S, Koppelman SJ, Pellegrum H, Penninks AH. Identification and partial characterization of multiple major allergens in peanut proteins. *Clin Exp Allergy.* 1998;28(6):743-51.
186. Koppelman SJ, Vlooswijk RA, Knippels LM, Hessing M, Knol EF, van Reijssen FC, et al. Quantification of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2 in the peanut varieties Runner, Spanish, Virginia, and Valencia, bred in different parts of the world. *Allergy.* 2001;56(2):132-7.
187. Koppelman SJ, Knol EF, Vlooswijk RA, Wensing M, Knulst AC, Hefle SL, et al. Peanut allergen Ara h 3: isolation from peanuts and biochemical characterization. *Allergy.* 2003;58(11):1144-51.
188. Mittag D, Akkerdaas J, Ballmer-Weber BK, Vogel L, Wensing M, Becker WM, et al. Ara h 8, a Bet v 1-homologous allergen from peanut, is a major allergen in patients with combined birch pollen and peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114(6):1410-7.
189. Vereda A, van Hage M, Ahlstedt S, Ibanez MD, Cuesta-Herranz J, van Odijk J, et al. Peanut allergy: Clinical and immunologic differences among patients from 3 different geographic regions. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(3):603-7.
190. Lack G, Fox D, Northstone K, Golding J, Avon Longitudinal Study of P, Children Study T. Factors associated with the development of peanut allergy in childhood. *The New England journal of medicine.* 2003;348(11):977-85.
191. Wensing M, Knulst AC, Piersma S, O'Kane F, Knol EF, Koppelman SJ. Patients with anaphylaxis to pea can have peanut allergy caused by cross-reactive IgE to vicilin (Ara h 1). *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111(2):420-4.

BIBLIOGRAFÍA

192. Barnett D, Bonham B, Howden ME. Allergenic cross-reactions among legume foods--an in vitro study. *J Allergy Clin Immunol*. 1987;79(3):433-8.
193. Sicherer SH, Burks AW, Sampson HA. Clinical features of acute allergic reactions to peanut and tree nuts in children. *Pediatrics*. 1998;102(1):e6.
194. Maloney JM, Rudengren M, Ahlstedt S, Bock SA, Sampson HA. The use of serum-specific IgE measurements for the diagnosis of peanut, tree nut, and seed allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122(1):145-51.
195. Bock SA, Atkins FM. The natural history of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 1989;83(5):900-4.
196. Couch C, Franxman T, Greenhawt M. Characteristics of tree nut challenges in tree nut allergic and tree nut sensitized individuals. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2017;118(5):591-6.e3.
197. Barre A, Borges JP, Culerrier R, Rouge P. Homology modelling of the major peanut allergen Ara h 2 and surface mapping of IgE-binding epitopes. *Immunol Lett*. 2005;100(2):153-8.
198. de Leon MP, Drew AC, Glaspole IN, Suphioglu C, O'Hehir RE, Rolland JM. IgE cross-reactivity between the major peanut allergen Ara h 2 and tree nut allergens. *Molecular immunology*. 2007;44(4):463-71.
199. Bindslev-Jensen C, Ballmer-Weber BK, Bengtsson U, Blanco C, Ebner C, Hourihane J, et al. Standardization of food challenges in patients with immediate reactions to foods--position paper from the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy*. 2004;59(7):690-7.
200. Skin tests used in type I allergy testing Position paper. Sub-Committee on Skin Tests of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy*. 1989;44 Suppl 10:1-59.
201. García Robaina J.C, Hernández Santana G, Díaz Perera E. Técnicas diagnósticas in vivo. In: Dávila González IJ JPI, Olaguibel Rivera JM, Zubeldia Ortuño JM, editor. *Tratado de Alergología*. I. 2 ed. Madrid: Ergon; 2016. p. 151-60.
202. Niemeijer NR, Goedewaagen B, Kauffman HF, de Monchy JG. Optimization of skin testing. I. Choosing allergen concentrations and cutoff values by factorial design. *Allergy*. 1993;48(7):491-7.
203. Harwanegg C, Laffer S, Hiller R, Mueller MW, Kraft D, Spitzauer S, et al. Microarrayed recombinant allergens for diagnosis of allergy. *Clin Exp Allergy*. 2003;33(1):7-13.
204. Jahn-Schmid B, Harwanegg C, Hiller R, Bohle B, Ebner C, Scheiner O, et al. Allergen microarray: comparison of microarray using recombinant allergens with conventional diagnostic methods to detect allergen-specific serum immunoglobulin E. *Clin Exp Allergy*. 2003;33(10):1443-9.

BIBLIOGRAFÍA

205. Harwanegg C, Hiller R. Protein microarrays for the diagnosis of allergic diseases: state-of-the-art and future development. *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 2006;38(7):232-6.
206. Ibañez Sandín M.D.P, Diéguez Pastor M.J, Goikoetxea Lapresa M.J. Metodología diagnóstica en la alergia a los alimentos. In: Dávila González IJ JPI, Olaguibel Rivera JM, Zubeldia Ortuño JM, editor. *Tratado de Alergología. III.* Madrid: Ergon; 2016. p. 1071-92.
207. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
208. Fountoulakis M, Lahm HW. Hydrolysis and amino acid composition of proteins. *Journal of chromatography A.* 1998;826(2):109-34.
209. Calamelli E, Caffarelli C, Ricci G. Peanut sensitization profiles in Italian children and adolescents with specific IgE to peanuts. *BioMed research international.* 2013;2013:170452.
210. Masthoff LJ, Mattsson L, Zuidmeer-Jongejan L, Lidholm J, Andersson K, Akkerdaas JH, et al. Sensitization to Cor a 9 and Cor a 14 is highly specific for a hazelnut allergy with objective symptoms in Dutch children and adults. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132(2):393-9.
211. Crespo JF, Pascual C, Burks AW, Helm RM, Esteban MM. Frequency of food allergy in a pediatric population from Spain. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology.* 1995;6(1):39-43.
212. Moneret-Vautrin DA, Morisset M. Adult food allergy. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2005;5(1):80-5.
213. Mattila L, Kilpelainen M, Terho EO, Koskenvuo M, Helenius H, Kalimo K. Food hypersensitivity among Finnish university students: association with atopic diseases. *Clin Exp Allergy.* 2003;33(5):600-6.
214. Zuberbier T, Edenharter G, Worm M, Ehlers I, Reimann S, Hantke T, et al. Prevalence of adverse reactions to food in Germany - a population study. *Allergy.* 2004;59(3):338-45.
215. Benard A, Desreumeaux P, Huglo D, Hoorelbeke A, Tonnel AB, Wallaert B. Increased intestinal permeability in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1996;97(6):1173-8.
216. Sicherer SH, Sampson HA. Peanut and tree nut allergy. *Curr Opin Pediatr.* 2000;12(6):567-73.
217. Weinberger T, Sicherer S. Current perspectives on tree nut allergy: a review. *Journal of asthma and allergy.* 2018;11:41-51.
218. Summers CW, Pumphrey RS, Woods CN, McDowell G, Pemberton PW, Arkwright PD. Factors predicting anaphylaxis to peanuts and tree nuts in patients referred to a specialist center. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(3):632-8 e2.
219. Bock SA, Munoz-Furlong A, Sampson HA. Fatalities due to anaphylactic reactions to foods. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;107(1):191-3.

BIBLIOGRAFÍA

220. Bock SA, Munoz-Furlong A, Sampson HA. Further fatalities caused by anaphylactic reactions to food, 2001-2006. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(4):1016-8.
221. Cuesta-Herranz J, Lazaro M, Martinez A, Figueredo E, Palacios R, de-Las-Heras M, et al. Pollen allergy in peach-allergic patients: sensitization and cross-reactivity to taxonomically unrelated pollens. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104(3 Pt 1):688-94.
222. Du Toit G, Lack G. Optimizing the diagnosis of peanut and tree nut allergy. *Clin Exp Allergy*. 2003;33(8):1019-22.
223. Johnson J, Malinovschi A, Alving K, Lidholm J, Borres MP, Nordvall L. Ten-year review reveals changing trends and severity of allergic reactions to nuts and other foods. *Acta Paediatr*. 2014;103(8):862-7.
224. Uotila R, Kukkonen AK, Pelkonen AS, Makela MJ. Cross-sensitization profiles of edible nuts in a birch-endemic area. *Allergy*. 2016;71(4):514-21.
225. Asero R. Detection and clinical characterization of patients with oral allergy syndrome caused by stable allergens in Rosaceae and nuts. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 1999;83(5):377-83.
226. Lázaro M. Alergia al melocotón: estudio epidemiológico, clínico e inmunológico. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca. 1997.
227. Figueredo E, Cuesta-Herranz J, De-Miguel J, Lazaro M, Sastre J, Quirce S, et al. Clinical characteristics of melon (*Cucumis melo*) allergy. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2003;91(3):303-8.
228. Le TM, Lindner TM, Pasmans SG, Guikers CL, van Hoffen E, Bruijnzeel-Koomen CA, et al. Reported food allergy to peanut, tree nuts and fruit: comparison of clinical manifestations, prescription of medication and impact on daily life. *Allergy*. 2008;63(7):910-6.
229. Vierk K, Falci K, Wolyniak C, Klontz KC. Recalls of foods containing undeclared allergens reported to the US Food and Drug Administration, fiscal year 1999. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;109(6):1022-6.
230. Lieberman P, Nicklas RA, Randolph C, Oppenheimer J, Bernstein D, Bernstein J, et al. Anaphylaxis--a practice parameter update 2015. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2015;115(5):341-84.
231. Ehlers I, Hipler UC, Zuberbier T, Worm M. Ethanol as a cause of hypersensitivity reactions to alcoholic beverages. *Clin Exp Allergy*. 2002;32(8):1231-5.
232. Garcia-Robaina JC, de la Torre-Morin F, Sanchez-Machin I, Sanchez-Monge R, Barber D, Lombardero M. Anaphylaxis induced by exercise and wine. *Allergy*. 2001;56(4):357-8.
233. Cardona V, Luengo O, Garriga T, Labrador-Horrillo M, Sala-Cunill A, Izquierdo A, et al. Co-factor-enhanced food allergy. *Allergy*. 2012;67(10):1316-8.

BIBLIOGRAFÍA

234. Romano A, Scala E, Rumi G, Gaeta F, Caruso C, Alonzi C, et al. Lipid transfer proteins: the most frequent sensitizer in Italian subjects with food-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Clin Exp Allergy*. 2012;42(11):1643-53.
235. Munoz-Garcia E, Luengo-Sanchez O, Moreno-Perez N, Cuesta-Herranz J, Pastor-Vargas C, Cardona V. Lettuce Allergy Is a Lipid Transfer Syndrome-Related Food Allergy With a High Risk of Severe Reactions. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2017;27(2):98-103.
236. Martin Munoz F, Lopez Cazana JM, Villas F, Contreras JF, Diaz JM, Ojeda JA. Exercise-induced anaphylactic reaction to hazelnut. *Allergy*. 1994;49(5):314-6.
237. Kutting B, Brehler R. Exercise-induced anaphylaxis. *Allergy*. 2000;55(6):585-6.
238. Mota I, Gaspar A, Benito-Garcia F, Correia M, Arede C, Piedade S, et al. Anaphylaxis caused by lipid transfer proteins: an unpredictable clinical syndrome. *Allergologia et immunopathologia*. 2018;46(6):565-70.
239. Aleman A, Sastre J, Quirce S, de las Heras M, Carnes J, Fernandez-Caldas E, et al. Allergy to kiwi: a double-blind, placebo-controlled food challenge study in patients from a birch-free area. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113(3):543-50.
240. Javaloyes G, Goikoetxea MJ, Garcia Nunez I, Aranda A, Sanz ML, Blanca M, et al. Pru p 3 acts as a strong sensitizer for peanut allergy in Spain. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(6):1432-4.e3.
241. Asturias JA, Ibarrola I, Fernandez J, Arilla MC, Gonzalez-Rioja R, Martinez A. Phod 2, a major allergen from date palm pollen, is a profilin: cloning, sequencing, and immunoglobulin E cross-reactivity with other profilins. *Clin Exp Allergy*. 2005;35(3):374-81.
242. Asero R, Jimeno L, Barber D. Preliminary results of a skin prick test-based study of the prevalence and clinical impact of hypersensitivity to pollen panallergens (polcalcin and profilin). *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2010;20(1):35-8.
243. Stiefel G, Anagnostou K, Boyle RJ, Brathwaite N, Ewan P, Fox AT, et al. BSACI guideline for the diagnosis and management of peanut and tree nut allergy. *Clin Exp Allergy*. 2017;47(6):719-39.
244. Griffiths RLM, El-Shanawany T, Jolles SRA, Selwood C, Heaps AG, Carne EM, et al. Comparison of the Performance of Skin Prick, ImmunoCAP, and ISAC Tests in the Diagnosis of Patients with Allergy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2017;172(4):215-23.
245. De Knop KJ, Verweij MM, Grimmelikhuijsen M, Philipse E, Hagendorens MM, Bridts CH, et al. Age-related sensitization profiles for hazelnut (*Corylus avellana*) in a birch-endemic region. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2011;22(1 Pt 2):e139-49.
246. Goikoetxea MJ, D'Amelio CM, Martinez-Aranguren R, Gamboa P, Garcia BE, Gomez F, et al. Is Microarray Analysis Really Useful and Sufficient to Diagnose Nut Allergy in the Mediterranean Area? *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2016;26(1):31-9.

BIBLIOGRAFÍA

247. Hartz C, Lauer I, del Mar San Miguel Moncin M, Cistero-Bahima A, Foetisch K, Lidholm J, et al. Comparison of IgE-binding capacity, cross-reactivity and biological potency of allergenic non-specific lipid transfer proteins from peach, cherry and hazelnut. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;153(4):335-46.
248. Faber MA, Van Gasse AL, Decuyper, II, Uyttebroek A, Sabato V, Hagendorens MM, et al. IgE-reactivity profiles to nonspecific lipid transfer proteins in a northwestern European country. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(2):679-82.e5.
249. Scala E, Till SJ, Asero R, Abeni D, Guerra EC, Pirrotta L, et al. Lipid transfer protein sensitization: reactivity profiles and clinical risk assessment in an Italian cohort. *Allergy*. 2015;70(8):933-43.
250. Datema MR, Zuidmeer-Jongejan L, Asero R, Barreales L, Belohlavkova S, de Blay F, et al. Hazelnut allergy across Europe dissected molecularly: A EuroPrevall outpatient clinic survey. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(2):382-91.
251. van der Valk JPM, Bouche RE, Gerth van Wijk R, de Groot H, Wichers HJ, Dubois AEJ, et al. Low percentage of clinically relevant pistachio nut and mango co-sensitisation in cashew nut sensitised children. *Clin Transl Allergy*. 2017;7:8.
252. Moreno FJ, Clemente A. 2S Albumin Storage Proteins: What Makes them Food Allergens? *Open Biochem J*. 2008;2:16-28.
253. Koppelman SJ, de Jong GA, Laaper-Ertmann M, Peeters KA, Knulst AC, Hefle SL, et al. Purification and immunoglobulin E-binding properties of peanut allergen Ara h 6: evidence for cross-reactivity with Ara h 2. *Clin Exp Allergy*. 2005;35(4):490-7.
254. Oppel T, Thomas P, Wollenberg A. Cross-sensitization between poppy seed and buckwheat in a food-allergic patient with poppy seed anaphylaxis. *Int Arch Allergy Immunol*. 2006;140(2):170-3.
255. Bueno C, Cuesta-Herranz J, Villalba M. Is the cross-reactivity of Sin a 1, 2S albumin from mustard seeds, exclusively restricted to Brassicaceae members? . *JSM Allergy and Asthma*. 2016;1(1):1001.

ANEXOS

ANEXO 1. Consentimiento Informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO

INFORMACION BASICA Y OBJETIVO

Por la presente, se le solicita su participación en un estudio en colaboración con la Escuela Técnica de Ingenieros Agrónomos (Universidad Politécnica de Madrid) para estudiar los componentes alergénicos de alimentos, a los cuales usted es alérgico.

PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

Si es usted alérgico a alimentos y decidiera participar en el estudio, su participación consistiría únicamente en una extracción adicional de sangre. Para niños menores de 6 años será de 5 ml y entre 6 y 12 años de 10 ml.

RIESGOS Y BENEFICIOS

Las pruebas se realizarán utilizando el suero extraído y por lo tanto no existe ningún riesgo para el paciente. Los beneficios que obtiene por su participación se derivan de la identificación de los alérgenos de la mostaza. Además, participando en este estudio contribuye a la investigación tanto en el campo de las causas de la alergia alimentaria como a mejorar el diagnóstico y hacer posible el uso de nuevos tratamientos para esta enfermedad.

CONFIDENCIALIDAD

Los datos derivados de su participación en el estudio se facilitarán al promotor del estudio y solo aparecerán sus iniciales y no su nombre. Es posible que el promotor y las autoridades sanitarias, necesiten revisar su historia médica para confirmar la información recogida. Su nombre nunca aparecerá en ningún informe, salvo en el que se le entregue.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Su participación en este estudio es voluntaria. En caso de que decidiera no participar, no perdería ninguno de los beneficios de atención sanitaria a los que tiene derecho.

DECLARACIÓN DEL PACIENTE

Otorgo voluntariamente mi consentimiento a participar en este estudio. He leído y comprendido este documento de consentimiento informado y los riesgos que en él se describen. Comprendo

que puedo retirar mi consentimiento o retirarme de este estudio en cualquier momento sin pérdida alguna de los beneficios a los que tengo derecho.

Título del estudio: Alérgenos de pólenes y alimentos vegetales. Aplicaciones de nuevas tecnologías.

Yo (nombre y apellidos)

- He leído la hoja de información que se me ha entregado
- He podido hacer preguntas sobre el estudio
- He recibido suficiente información sobre el estudio

He hablado con: El Dr.

(nombre del investigador)

- Comprendo que mi participación es voluntaria
- Comprendo que puedo retirarme del estudio.
 - Cuando quiera
 - Sin tener que dar explicaciones
 - Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Y presto libremente mi conformidad para participar en el estudio

Nombre del participante/tutor

Fecha/ firma del participante

Nombre del médico responsable

Fecha/ firma del médico responsable

Firma del voluntario

Firma del investigador

Fecha (día/mes/año)

ANEXO 2. Cuestionario de alergia a alimentos vegetales

Cuestionario de alergia a alimentos vegetales

Nombre del paciente: _____ Iniciales: _____
Fecha de nacimiento: _____ Número: _____
Sexo: ☐ Hombre ☐ Mujer
Lugar de nacimiento: _____ Teléfono: _____
Lugar de residencia: _____
¿Desde cuando? _____ (años)
Profesión: _____ NHC: _____
Fecha: _____

1. ALERGIA RESPIRATORIA:

a. ¿Tiene alergia al polen?

☐ Sí ☐ No

☐

b. ¿Tiene síntomas oculonasales? ☐ Sí ☐ No

Año de inicio: _____ Años de Evolución: _____

b. ¿Tiene también asma? ☐ Sí ☐ No

Año de inicio: _____ Años de Evolución: _____

d. Época del año:

☐ Enero-febrero

☐ Abril

☐ Mayo-Junio

☐ Septiembre-Octubre

¿Tiene síntomas con los siguientes alimentos? (rellenar una sola hoja por paciente)

	sí	no	no sabe
Almendra			
Avellana			
Cacahuete			
Castaña			
Nuez			
Piñón			
Pistacho			
Anacardo			
Nuez de Brasil			
Pipas			
Melocotón			
Manzana			
Pera			
Albaricoque			
Cereza			
Ciruela			
Coco			
Fresa			
Nectarina			
Níspero			
Kiwi			
Plátano			
Aguacate			
Piña			
Mango			
Naranja			
Limón			
Higo			
Chirimoya			

	sí	no	No sabe
Sésamo			
Lenteja			
Alubia			
Guisante			
Garbanzo			
Soja			
Endivia			
Escarola			
Lechuga			
Manzanilla			
Brecol			
Coliflor			
Mostaza			
Repollo			
Acelga			
Espinaca			
Remolacha			
Berenjena			
Patata			
Pimiento			
Tomate			
Apio			
Zanahoria			
Calabacín			
Calabaza			
Pepino			
Melón			
Sandía			
Ajo, cebolla, puerro			

Rellenar uno de los siguientes cuestionarios para cada alimento que refiera el paciente

En el caso de pacientes polínicos sin alergia a alimentos vegetales: fin del cuestionario

Alimento: _____ **Número:** _____ **NHC:** _____

1. ¿Qué tipo de síntomas tiene con este alimento?

a. **Síntomas orales**

☐ Síndrome de alergia oral

b. **Síntomas cutáneos**

☐ Urticaria

☐ Angioedema

☐ Urticaria de contacto

c. **Síntomas digestivos**

☐ Náuseas

☐ Vómitos

☐ Epigastralgia / pirosis

☐ Dolor abdominal

☐ Diarrea

d. **Síntomas respiratorios**

☐ Asma

☐ Rinoconjuntivitis

anafilaxia

☐ Anafilaxia (dos o más órganos implicados)

☐ AIE (anafilaxia inducida por ejercicio)

☐ Shock anafiláctico

e. **Otros síntomas**

Explicar: _____

2. Año de comienzo de los síntomas: _____

¿Cuánto tiempo tardan los síntomas en aparecer tras la ingesta?

<input type="checkbox"/> < 5 minutos	<input type="checkbox"/> 5-30 minutos	<input type="checkbox"/> 30-60 minutos	<input type="checkbox"/> > 60
--------------------------------------	---------------------------------------	--	-------------------------------

3. ¿Ha necesitado alguna vez tratamiento de urgencia tras las reacciones?

☐ Sí

☐ No

¿Ha necesitado alguna vez medicación tras las reacciones?

☐ Sí En caso afirmativo: ☐ antihistamínicos ☐ corticoides ☐ adrenalina ☐ otros
☐ No

4. En el caso de frutos secos: ¿Qué mínima cantidad necesita ingerir para tener síntomas?

☐ Como alimento oculto

☐ Uno

☐ De 2 a 5

☐ De 5 a 10

☐ Mas de 10

5. ¿Está implicado un cofactor en el desencadenamiento de síntomas?

☐ NO

☐ Ejercicio

☐ Analgésico:

☐ Otro:

ANEXO 3. Niveles de IgE específica (ImmunoCAP)

Tabla 1

Nº	Edad	Sexo	Pru p 3	Phl p 12	Bet v 1	Cacahuete	Avellana	Nuez
1	37	M	6,02	NR	0	1,17	2,88	5,09
2	20	V	0,42	0,4	0	0,96	2,79	0,25
3	50	V	4	0,18	0,02	1,37	0,94	2,94
4	26	M	0,01	0	0	0,04	0,02	0
5	22	V	19,2	0,08	0,01	4,65	3,22	12,3
6	20	M	9,35	0	0	2,42	0,85	4,77
7	20	V	0,02	15,7	0,01	8,84	0,69	1,88
8	23	V	4,35	0	0	3,19	0,72	3,01
9	45	V	38,3	NR	NR	11,1	1,77	13,9
10	21	M	5,75	0	0	1,97	1,17	2,66
11	22	V	1,4	NR	2,06	0,73	0,62	8,81
12	27	V	1,11	0,47	0	0,47	0	0,42
13	12	V	1,11	0,47	0	0,47	0	0,42
14	34	V	7,83	NO	1,67	4,14	0,78	0,65
15	40	V	1,26	0,01	0	0,65	0,39	1,08
16	32	M	4,12	0,16	0,02	1,78	1,36	2,67
17	29	V	2,4	0,02	0,01	2,31	0,85	3,12
18	40	V	12,6	0,03	NR	5,73	4,09	10,9
19	32	M	0,11	0,02	NR	0,13	0,07	0,08
20	32	V	0,22	20,2	NR	20,8	1,19	1,87
21	25	M	27,1	0,05	NR	9,58	5,59	18,8
22	39	V	3,02	0	6,84	0,41	16,6	1,95
23	25	M	32,3	0,1	NR	5,44	2,15	19,6
24	60	M	0,72	0,03	0,01	1,22	0,14	0,52
25	28	M	0,01	6,01	0	3,22	0,54	0,87
26	39	M	1,2	0,66	0	0,93	0,65	1,28
27	44	M	0,01	0	0	0	0,09	0
28	38	M	0,23	0,02	0,03	0,04	0,84	5,84
29	17	M	3,9	0,34	0	1,95	0,98	3,13
30	16	V	0,27	0,05	0	0,12	0,05	0,14
31	39	M	2,86	0,01	0	1,23	0,12	2,03
32	40	M	0,04	NR	0	0,03	0,13	NR
33	4	V	0,03	0,01	0,04	100	0,17	2,24
34	12	M	23,7	0,1	0,1	3	11,3	19,9
35	26	V	100	0,22	0,2	33,3	22,6	59,1
36	40	V	7,58	0	0	2,2	2,79	6,76
37	63	M	12,9	NR	NR	19,5	NR	5,73
38	3	V	1	0,09	1,25	0,03	0,61	0,01
39	53	M	5,87	8,79	5,09	8,47	3,54	6,17
40	33	V	0,19	0,02	0,06	1,82	0,85	NR
41	7	V	3,34	0	2,21	3,17	6,18	4,99
42	39	V	0,04	1,35	0,01	0,56	0,21	0,19
43	52	M	0,15	5,96	0,08	3,64	1,41	1,52
44	29	M	2,03	0	0,01	0,12	0,18	0,87
45	29	V	44,4	0	0	24,2	14,5	33,6
46	25	M	95,5	0,07	0,04	1,95	3,36	3,28
47	29	V	0	0,03	0	100	2,08	3,11
48	13	M	1,79	0,02	0,02	0,62	0,28	0,67
49	31	V	3,18	0,3	0,01	2,01	1,66	2,61

Tabla 2

Nº	Ara h 9	Cor a 8	Almendra	Castaña	Pistacho	Piñón	Anacardo
1	1,42	3,51	0,93	0,78	0,03	0,14	0,04
2	0,53	3,18	0,38	0,26	0,18	0,12	0,08
3	1,81	2,58	0,25	1,26	0,05	0,11	0,03
4	0	0	0,02	0,05	0,02	0,03	0,01
5	14,6	8,85	2,22	1,45	2,14	0,11	1,75
6	3,2	2,89	0,81	0,05	0,06	0	0
7	0,01	0	0,37	4,48	0,67	0,92	0,2
8	3,33	1,59	0,73	1,1	0,04	0,32	0,03
9	NR	NR	5,34	3,31	0	NR	0
10	1,46	NR	1,04	1,58	0	0	0
11	NR	NR	0,46	0,81	2,2	0	NR
12	0,39	0	0	0	0	0	0
13	0,39	0	0	0	0	0	0
14	4,43	NR	2,01	1,42	0,94	NR	1,02
15	0,76	0,46	0,22	0,28	0,02	0	0
16	1,05	2,81	0,56	0,58	0,13	0,03	0,01
17	2,35	0,46	1,88	1,91	0,62	NR	0,21
18	7,38	4,2	4,28	4,07	0,51	0,06	0,16
19	0,05	0,01	0,12	0,1	0,07	0,83	0,05
20	0	0	0,65	8,73	1,32	4,46	0,19
21	18,6	11,5	2,73	4,26	0,38	2,18	0,05
22	0,39	0,39	0,42	0	0	0	0
23	18,1	16	0,56	6,71	0,24	0,12	0,11
24	0,43	0,22	0,14	0,2	0,04	0,07	0,04
25	0	0	0,64	3,15	0,71	1,68	0,27
26	1,27	0,67	0,28	0,5	0,13	0,28	0,08
27	0,01	0	0,03	0,02	0,01	0,03	0
28	0,09	0	0,02	0,14	0,04	0,02	0,18
29	3,2	1,98	0,9	1,77	0,14	0,09	0,07
30	0,13	0,07	0,04	0,06	0,1	0	0,08
31	4,16	0,03	0,11	0,79	0,03	0,03	0
32	0	0	0,02	0,05	85,6	0	59,1
33	0	0	0,5	0,08	2,08	0,05	1,03
34	17,6	13,9	1,75	1,7	0,87	0,51	0,21
35	100	46,8	15,8	12,8	7,35	3	3,31
36	6,58	5,93	1,01	1	0,08	0	0
37	11,3	NO	7,72	NR	0,85	NR	NR
38	0	0	0,4	0,21	0,1	0,01	0,03
39	0,53	0,12	3,56	8,47	1,58	1,74	0,48
40	0,01	0	0,13	1,88	0,84	0,65	NR
41	5,56	1,46	1,28	1,83	0,63	0,47	0,14
42	0,02	0	3,72	0,53	0,76	0,12	0,05
43	0,07	0,07	1,76	3,03	2,21	1,97	1,08
44	0,16	0,21	0,12	0,03	0,31	0,01	0,12
45	40,6	15,5	5,93	13,3	1,18	1,83	0
46	44,4	3,64	4,6	4,56	1,8	0,75	0,43
47	0	0	3	0,12	1,6	0,11	1,47
48	0,29	0,1	0,3	0,5	0,41	0,3	0,19
49	1,86	1,87	1,38	1,7	0,7	0,31	0,06

Tabla 3

Nº	Art v 3	Ana c 2	Bere 1	Ara h 1	Ara h 2	Ara h 3
1	1,27	NR	0	0	0	NR
2	0	0,79	0	0,01	0,05	NR
3	2,74	0,17	0,02	0,04	0,04	NR
4	0	0,03	0	0	0,03	NR
5	6,43	0,14	NR	NR	NR	NR
6	0,15	0,02	0	0	0,02	NR
7	0,02	0,03	0	0,03	0,03	0,15
8	2,32	NR	0	0,01	0,03	NR
9	NR	NR	NR	0	0	NR
10	2,35	NR	0	0	0	0
11	0,45	NR	0	0	0	NR
12	0	NR	0	0	0	NR
13	0	NR	0	0	0	NR
14	0	NR	0	0	0	NR
15	0,52	0,01	0	0	0,11	NR
16	5,41	0,04	0	0,01	0,09	NR
17	3,01	0,14	0	0,01	0,22	NR
18	8,85	0,03	0,01	0,03	0,02	0,02
19	NR	0,11	0	0,02	0,03	0,02
20	0,01	2,97	0,03	0,04	0,02	0,03
21	NR	0,3	0,02	0,01	0,03	0,09
22	0,18	NR	0	0,02	0,03	0
23	0,5	0,08	0,05	0,06	0,08	0,09
24	0,23	0,04	0,01	0,03	0,01	0,01
25	0	0,2	0,02	0	0	0
26	1,91	0,11	0	0,02	0	0,02
27	0,01	0,03	0,01	0,01	0	0
28	0	0,11	0,01	0,02	0,04	0,02
29	1,92	0,14	0	0	0	0
30	0,08	0,03	0	0	0	0,02
31	1,1	0,01	0,19	0	0	0,01
32	NR	0,02	0,11	0	NR	NR
33	0	0,02	0,05	38	59,7	8,35
34	1,72	0,29	0,08	0,08	0,07	0,08
35	28,3	2,13	0,36	0,26	0,22	NR
36	2,73	0	0,06	0	0	0
37	NR	NR	0,03	15,6	0	0,02
38	0	0,03	0,03	0	0,01	0
39	0,34	1,88	0,23	0,13	0,06	0,09
40	0,01	0,49	0,06	0	0,01	0,01
41	1,39	0,32	0,18	0	0	0,01
42	0	0,15	0,11	0,02	0	0,01
43	0,04	1,48	0,15	0,07	0,09	0,1
44	0	0,01	0,02	0	0	0
45	NR	0	NR	0	0	0
46	29,3	0,65	0,05	0,02	0,05	0,06
47	0	0	0,02	51	66,5	47,8
48	0,26	0,26	0,03	0,01	0,01	0,01
49	1,57	0,1	0,07	0	0	0,05

Tabla 4

Nº	Edad	Sexo	Pru p 3	Phl p 12	Bet v 1	Ara h 9	Cor a 8	Cacahuete	Avellana	Almendra	Castaña	Pistacho	Piñón	Nuez
1	58	M	0	0	4,99	0	0	0,26	2,5	0,21	0,73	0,01	0	0
2	79	M	0,06	NR	NR	0	0	0,06	0,04	0,83	0,06	0,14	0,06	NR
3	42	M	0,09	0,04	85,4	0,06	0	0,37	57,9	2,02	10,1	0,04	0,02	0,04
4	35	M	0,01	0	14	0	0	0,01	4,74	0,19	0,66	0,01	0	0
5	39	V	1,09	0,02	0,92	0,33	0,25	0,31	0,66	0,19	0,41	0,03	0,13	0,42
6	30	V	0,54	0,49	3,12	0,12	0,08	2,3	2,07	0,1	1,12	2,12	0,18	0,69
7	14	V	0,03	0,01	0	0	0	0,02	0,04	0,01	0,04	0,02	0,01	1,22
8	6	V	0,02	0,02	0	0	0	1,33	0,81	0,1	0,16	0,15	0,01	48,4
9	6	V	0,53	0,03	0,03	0,13	8,83	0,32	22,5	0,26	2,91	0,28	0,4	7,36
10	29	V	56,5	0,11	0,06	27,1	12,1	8,41	14,8	7,98	5,46	0,91	3,19	38,8
11	8	M	0,15	0,11	0,14	0,06	0,04	0,54	1,48	0,43	0,57	0,45	0,44	3,69
12	27	V	9,07	0,06	0,03	3,43	1,26	1,66	1,9	0,85	3,02	1,66	0,62	5,06
13	24	M	0	0,04	1,87	NR	0	0,53	1,81	0,03	0,45	0,06	NR	0,04
14	41	V	1,76	0,01	0	1,62	0,94	1,13	1,08	0,34	1,35	0,1	0,05	1,69
15	44	V	9,66	0,01	0,01	0,69	0,22	0,25	0,58	0,49	0,19	0,08	0,02	0,84
16	37	V	0,3	0	0	0,06	0,13	0,02	0,05	0	0,03	0,02	0	0,06
17	30	V	26,8	0,06	0,03	8,76	1,36	4,66	3,79	1,09	1,09	0,17	0,1	5,15
18	16	V	0,04	0,03	34,4	0,05	0,02	8,63	24,5	1,6	6,95	0,11	0,1	0,09
19	40	M	2,64	0	2,46	5,44	0,77	0,07	1,18	0,93	0,2	0,11	0	0,29
20	31	V	11	0,04	0,06	4,71	9,38	4,48	5,36	1,1	1,39	0,34	0,09	4,95
21	16	V	0,05	0,03	0,02	0	0	16,2	0,04	0,21	0,1	0,03	0,02	1,5
22	12	M	0,13	0,81	17,4	0,08	0	4,29	9,54	0,29	2,28	5,65	0,07	2,85
23	61	M	0,03	0,61	12	0	0	0,55	5,09	0,35	0,4	0,18	0,07	0,07
24	51	V	0,17	3,21	18,9	0	0,07	2,14	7,69	0,1	0,79	0,09	0,18	0,19
25	47	M	4,54	0	0	2,25	1,23	1,3	0,52	0,27	0,07	0,14	0,99	3,17
26	33	M	14	0	0	7,54	5,99	3,06	2,31	2,9	2,51	0,15	0,05	8,27
27	45	M	0	0	0,82	0	0	0,19	0,77	0	0,17	0,16	0	0,02
28	33	V	1,62	0	0	1,31	0	0,3	0,02	0,05	0,5	0,08	0	1,03

Tablas 1, 2 y 3: Determinación de IgE específica (kU/l) para extractos completos y proteínas recombinantes de Madrid. Tabla 4: Determinación de IgE específica para extractos completos y proteínas recombinantes de Asturias. V: varón; M: mujer; NR: no realizado

ANEXO 4. Trabajos realizados durante la Tesis Doctoral

-Blanca-Lopez N, **Haroun-Diaz E**, Ruano FJ, Perez-Alzate D, Somoza ML, Vazquez de la Torre Gaspar M, et al. Acetyl Salicylic Acid Challenge in Children with Hypersensitivity Reactions to Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Differentiates Between Cross-Intolerant and Selective Responders. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2018;6(4):1226-35.

-**Haroun-Diaz E**, Blanca-Lopez N, Vazquez de la Torre M, Ruano FJ, Somoza Alvarez ML, Labrador Horrillo M, et al. Severe anaphylaxis due to crocodile-meat allergy exhibiting wide cross-reactivity with fish allergens. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2017.

-**Haroun-Diaz E**, Azofra J, Gonzalez-Mancebo E, de Las Heras M, Pastor-Vargas C, Esteban V, et al. Nut Allergy in Two Different Areas of Spain: Differences in Clinical and Molecular Pattern. *Nutrients*. 2017;9(8).

-**Haroun-Diaz E**, Rodrigues-Barata R, Cuesta-Herranz J, Conde-Salazar L. Contact Dermatitis due to Lubricant Oils in a Brass Musician. *Annals of dermatology*. 2017;29(1):127-9.

-Antolin-Amerigo D, Rodriguez-Rodriguez M, Barbarroja-Escudero J, Sanchez-Gonzalez MJ, **Haroun-Diaz E**, Cuesta-Herranz J, et al. Linseed Allergy Due to LTP: Another Food for LTP Syndrome. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2016;26(6):376-7.

-Gonzalez-de-Olano D, Munoz-Garcia E, **Haroun-Diaz E**, Bartolome B, Pastor-Vargas C. Allergy to hedgehog with carboxypeptidase and chitinase-like and chymotrypsin-like elastase family members as the relevant allergens. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2016;116(3):256-7.

-Rodrigues Barata AR, **Haroun-Diaz E**, Conde-Salazar Gomez L. Can expired TRUE Test(R) be used for patch testing? *Contact dermatitis*. 2014;70(6):381-2.

-**Haroun-Diaz E**, Ruiz-Garcia M, De Luxan de la Lastra S, Pastor-Vargas C, De las Heras M, Sastre Dominguez J, et al. Contact dermatitis to both tropicamide and phenylephrine eye drops. *Dermatitis*. 2014;25(3):149-50.

ANEXO 5. Trabajos publicados relacionados con la tesis doctoral



nutrients



Article

Nut Allergy in Two Different Areas of Spain: Differences in Clinical and Molecular Pattern

Elisa Haroun-Díaz ¹, Julián Azofra ², Eloína González-Mancebo ³, Manuel de las Heras ¹, Carlos Pastor-Vargas ¹ , Vanesa Esteban ¹ , Mayte Villalba ⁴, Araceli Díaz-Perales ⁵ and Javier Cuesta-Herranz ^{1,*}

¹ Fundación IIS-Fundación Jiménez Díaz, 28040 Madrid, Spain; elisaharoun@hotmail.com (E.H.-D.); mheras@fjd.es (M.d.l.H.); cpastor@fjd.es (C.P.-V.); vesteban@fjd.es (V.E.)

² Allergy Department, Hospital Central de Asturias, 33011 Oviedo, Spain; julian.azofra@sespa.es

³ Unidad Alergia, Hospital Universitario de Fuenlabrada, 28942 Madrid, Spain; eloína.gonzalez@salud.madrid.org

⁴ Facultad de Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain; maytevillalbadiaz@gmail.com

⁵ Departamento de Biotecnología, ETS Ingenieros Agrónomos, 28040 Madrid, Spain; araceli.diaz@upm.es

* Correspondence: j.cuestaherranz@gmail.com; Tel.: +34-91-550-48-00; Fax: +34-91-544-82-46

Received: 2 June 2017; Accepted: 17 August 2017; Published: 21 August 2017

Abstract: Introduction: Different clinical and molecular patterns of food allergy have been reported in different areas of the world. The aim of the study is to evaluate differences in allergen patterns among nut-allergic patients in two different areas of Spain. Material and methods: A total of 77 patients with nut allergy from two different regions of Spain (Madrid and Asturias) were evaluated. Results: Hazelnut, peanut, and walnut were the three most frequent nuts eliciting allergy in both regions, but in a different order. Patients from Madrid experienced systemic reactions more often than patients from Asturias (73.5% Madrid vs. 50.0%, $p < 0.05$). The percentage of sensitizations to LTP (Lipid Transfer Protein) was higher than Bet v 1 ($p < 0.05$) in the Madrid area. The percentage of sensitizations in Asturias area was similar to LTP than Bet v 1 (Pru p 3 46.4%, Bet v 1 42.9%, ns). Bet v 1 was the predominant allergen involved among hazelnut-allergic patients (56.2%), while LTP was more common in peanut-allergic patients (61.5%). Conclusion: Walnut, hazelnut, and peanut were the most frequent nuts eliciting allergy in Spain. Despite this, important differences in molecular pattern were appreciated not only between both regions, but also among nut-allergic patients in Asturias. The different molecular pattern was linked to the frequency of systemic symptoms.

Keywords: nut allergy; peanut; walnut; hazelnut; Bet v 1; LTP; Pru p 3; Phl p 12

1. Introduction

Traditionally, the term anaphylaxis has referred to a systemic, immediate hypersensitivity reaction caused by IgE-mediated immunologic release of mediators from mast cells and basophils [1] and expressed by systemic symptoms (i.e., cutaneous, respiratory, gastrointestinal, or vascular symptoms). Food-induced anaphylaxis is a leading cause of anaphylaxis treated in emergency departments and hospitals around the world [2]. Nuts (including peanut and tree nuts) are one of the most common foods causing acute allergic reactions in children and adults, and nearly all nuts have been associated with fatal allergic reactions [3]. McWilliam et al. [3] evaluated the prevalence of tree nut allergy in different regions of the world by means of a systematic review. The results of the study proved that prevalence of individual nut allergies varied significantly by region, with hazelnut being the most common tree nut allergy in Europe, walnut and cashew in the USA, and Brazil nut, almond, and

walnut most commonly reported in the UK. In addition, peanut allergy was the leading cause of death related to food-induced anaphylaxis in the United States [4].

Component resolved diagnosis allows the study of the molecules or allergens involved in the nut allergic reactions. Many allergens have been reported from nuts [5,6] and in many cases cross-reactivity has been found among them [7].

Although most nuts (i.e., almond, hazelnut, pine nut, walnut, peanut, etc.) belong to different botanical families without taxonomical relationships, cross-reactivity can occur due to shared homologue proteins, since most of the nut allergens belong to a small number of protein families sharing a 3-D structure, biologic function, and sequence identity to varying degrees. Along with that, different protein families have been associated to different risks of systemic reactions or anaphylaxis [8,9]. In this sense, different clinical and molecular patterns of food allergy have been reported in different areas of the world [10,11].

Nut allergy has been associated with Bet v 1 sensitization in Europe, and in Spain, nut allergy has been associated with LTP sensitization [10,12,13]. In this study we describe differences in nut allergy in two different areas of Spain in which allergy was clearly associated with different molecular patterns of sensitization and differing risks of systemic symptoms.

2. Material and Methods

2.1. Study Population

A total of 77 patients with nut allergy from two different regions of Spain participated in the study: Madrid (*n*: 49; Fundación Jiménez Díaz Hospital; Tables 1 and 2) and Asturias (*n*: 28; Hospital Central de Asturias; Tables 3 and 4). Inclusion criteria were patients diagnosed with nut allergy recruited during 2013–2016. Nut allergy was diagnosed in patients having a clear history of adverse reactions due to any nut (peanut, tree nut allergy, etc.) suggestive of IgE-mediated allergy, showing positive skin prick tests, or specific IgE and/or food challenge tests, following the diagnostic algorithm of the Food Adverse Reaction Committee of Sociedad Española de Alergia e Inmunología Clínica [14]. Patients suffering severe systemic reactions to nuts, as well as patients with typical, recent, repeated, and unequivocal reactions who had positive skin tests/specific IgE, did not undergo an oral challenge test to diagnose plant-food allergy [14].

Table 1. Nut allergic patients from Madrid.

No.	Age	Sex	Specific IgE					
			Pru p 3	Phl p 12	Bet v 1	Peanut	Hazelnut	Walnut
1	37 years old	F	6.02	ND	0.00	1.17	2.88	5.09
2	20 years old	M	0.42	0.40	0.00	0.96	2.79	0.25
3	50 years old	M	4.00	0.18	0.02	1.37	0.94	2.94
4	26 years old	F	0.01	0.00	0.00	0.04	0.02	0.00
5	22 years old	M	19.20	0.08	0.01	4.65	3.22	12.30
6	20 years old	F	9.35	0.00	0.00	2.42	0.85	4.77
7	20 years old	M	0.02	15.70	0.01	8.84	0.69	1.88
8	23 years old	M	4.35	0.00	0.00	3.19	0.72	3.01
9	45 years old	M	38.30	ND	ND	11.1	1.77	13.9
10	21 years old	F	5.75	0.00	0.00	1.97	1.17	2.66
11	22 years old	M	1.40	ND	2.06	0.73	0.62	8.81
12	27 years old	M	1.11	0.47	0.00	0.47	0.00	0.42
13	12 years old	M	1.11	0.47	0.00	0.47	0.00	0.42
14	34 years old	M	7.83	ND	1.67	4.14	0.78	0.65
15	40 years old	M	1.26	0.01	0.00	0.65	0.39	1.08
16	32 years old	F	4.12	0.16	0.02	1.78	1.36	2.67
17	29 years old	M	1.79	0.02	0.02	0.62	0.28	0.67
18	40 years old	M	2.40	0.02	0.01	2.31	0.85	3.12
19	32 years old	F	12.60	0.03	ND	5.73	4.09	10.9

Table 1. Cont.

No.	Age	Sex	Specific IgE					
			Pru p 3	Phl p 12	Bet v 1	Peanut	Hazelnut	Walnut
20	32 years old	M	0.11	0.02	ND	0.13	0.07	0.08
21	25 years old	F	0.22	20.20	ND	20.8	1.19	1.87
22	29 years old	M	27.10	0.05	ND	9.58	5.59	18.8
23	25 years old	F	3.02	0.00	6.84	0.41	16.6	1.95
24	60 years old	F	32.30	0.10	ND	5.44	2.15	19.6
25	28 years old	F	0.72	0.03	0.01	1.22	0.14	0.52
26	39 years old	F	0.01	6.01	0.00	3.22	0.54	0.87
27	44 years old	F	1.20	0.66	0.00	0.93	0.65	1.28
28	38 years old	F	0.01	0.00	0.00	0.00	0.09	0.00
29	17 years old	F	0.23	0.02	0.03	0.04	0.84	5.84
30	16 years old	M	3.90	0.34	0.00	1.95	0.98	3.13
31	39 years old	F	0.27	0.05	0.00	0.12	0.05	0.14
32	40 years old	F	2.86	0.01	0.00	1.23	0.12	2.03
33	4 years old	M	0.04	ND	0.00	0.03	0.13	ND
34	12 years old	F	0.03	0.01	0.04	100	0.17	2.24
35	26 years old	M	23.70	0.10	0.10	3.00	11.30	19.9
36	40 years old	M	100.00	0.22	0.20	33.3	22.60	59.1
37	66 years old	F	7.58	0.00	0.00	2.20	2.79	6.76
38	3 years old	M	12.90	ND	ND	19.5	ND	5.73
39	53 years old	F	1.00	0.09	1.25	0.03	0.61	0.01
40	33 years old	M	5.87	8.79	5.09	8.47	3.54	6.17
41	7 years old	M	0.19	0.02	0.06	1.82	0.85	ND
42	39 years old	M	3.34	0.00	2.21	3.17	6.18	4.99
43	52 years old	F	0.04	1.35	0.01	0.56	0.21	0.19
44	29 years old	F	0.15	5.96	0.08	3.64	1.41	1.52
45	25 years old	M	2.03	0.00	0.01	0.12	0.18	0.87
46	29 years old	F	44.40	0.00	0.00	24.20	14.5	33.6
47	29 years old	M	95.50	0.07	0.04	1.95	3.36	3.28
48	13 years old	F	0.00	0.03	0.00	100.00	2.08	3.11
49	31 years old	M	3.18	0.30	0.01	2.01	1.66	2.61

F: Female; M: Male; ND: Not done.

Table 2. Nut allergic patients from Madrid.

No.	Specific IgE					
	Ara h 9	Cor a 8	Almond	Chestnut	Pistachio	Pinenut
1	1.42	3.51	0.93	0.78	0.03	0.14
2	0.53	3.18	0.38	0.26	0.18	0.12
3	1.81	2.58	0.25	1.26	0.05	0.11
4	0	0	0.02	0.05	0.02	0.03
5	14.6	8.85	2.22	1.45	2.14	0.11
6	3.2	2.89	0.81	0.05	0.06	0
7	0.01	0	0.37	4.48	0.67	0.92
8	3.33	1.59	0.73	1.1	0.04	0.32
9	ND	ND	5.34	3.31	0	ND
10	1.46	ND	1.04	1.58	0	0
11	ND	ND	0.46	0.81	2.2	0
12	0.39	0	0	0	0	0
13	0.39	0	0	0	0	0
14	4.43	ND	2.01	1.42	0.94	ND
15	0.76	0.46	0.22	0.28	0.02	0
16	1.05	2.81	0.56	0.58	0.13	0.03
17	0.29	0.1	0.3	0.5	0.41	0.3
18	2.35	0.46	1.88	1.91	0.62	ND
19	7.38	4.2	4.28	4.07	0.51	0.06
20	0.05	0.01	0.12	0.1	0.07	0.83
21	0	0	0.65	8.73	1.32	4.46
22	18.6	11.5	2.73	4.26	0.38	2.18
23	0.39	0.39	0.42	0	0	0
24	18.1	16	0.56	6.71	0.24	0.12
25	0.43	0.22	0.14	0.2	0.04	0.07

Table 2. Cont.

No.	Specific IgE					
	Ara h 9	Cor a 8	Almond	Chestnut	Pistachio	Pinenut
26	0	0	0.64	3.15	0.71	1.68
27	1.27	0.67	0.28	0.5	0.13	0.28
28	0.01	0	0.03	0.02	0.01	0.03
29	0.09	0	0.02	0.14	0.04	0.02
30	3.2	1.98	0.9	1.77	0.14	0.09
31	0.13	0.07	0.04	0.06	0.1	0
32	4.16	0.03	0.11	0.79	0.03	0.03
33	0	0	0.02	0.05	85.6	0
34	0	0	0.5	0.08	2.08	0.05
35	17.6	13.9	1.75	1.7	0.87	0.51
36	100	46.8	15.8	12.8	7.35	3
37	6.58	5.93	1.01	1	0.08	0
38	11.3	ND	7.72	ND	0.85	ND
39	0	0	0.4	0.21	0.1	0.01
40	0.53	0.12	3.56	8.47	1.58	1.74
41	0.01	0	0.13	1.88	0.84	0.65
42	5.56	1.46	1.28	1.83	0.63	0.47
43	0.02	0	3.72	0.53	0.76	0.12
44	0.07	0.07	1.76	3.03	2.21	1.97
45	0.16	0.21	0.12	0.03	0.31	0.01
46	40.6	15.5	5.93	13.3	1.18	1.83
47	44.4	3.64	4.6	4.56	1.8	0.75
48	0	0	3	0.12	1.6	0.11
49	1.86	1.87	1.38	1.7	0.7	0.31

F: Female; M: Male; ND: Not done.

Table 3. Nut allergic patients from Asturias.

No.	Age	Sex	Specific IgE					
			Pru p 3	Phl p 12	Bet v 1	Peanut	Hazelnut	Walnut
1	58 years old	F	0.00	0.00	4.99	0.26	2.50	0.00
2	79 years old	F	0.06	ND	ND	0.06	0.04	ND
3	42 years old	F	0.09	0.04	85.40	0.37	57.9	0.04
4	35 years old	F	0.01	0.00	14.00	0.01	4.74	0.00
5	39 years old	M	1.09	0.02	0.92	0.31	0.66	0.42
6	30 years old	M	0.54	0.49	3.12	2.30	2.07	0.69
7	14 years old	M	0.03	0.01	0.00	0.02	0.04	1.22
8	6 years old	M	0.02	0.02	0.00	1.33	0.81	48.40
9	6 years old	M	0.53	0.03	0.03	0.32	22.5	7.36
10	29 years old	M	56.5	0.11	0.06	8.41	14.8	38.8
11	8 years old	F	0.15	0.11	0.14	0.54	1.48	3.69
12	27 years old	M	9.07	0.06	0.03	1.66	1.90	5.06
13	24 years old	F	0	0.04	1.87	0.53	1.81	0.04
14	41 years old	M	1.76	0.01	0.00	1.13	1.08	1.69
15	44 years old	M	9.66	0.01	0.01	0.25	0.58	0.84
16	37 years old	M	0.3	0.00	00.00	0.02	0.05	0.06
17	30 years old	M	26.8	0.06	0.03	4.66	3.79	5.15
18	16 years old	M	0.04	0.03	34.4	8.63	24.50	0.09
19	40 years old	F	2.64	0.00	2.46	0.07	1.18	0.29
20	31 years old	M	11	0.04	0.06	4.48	5.36	4.95
21	16 years old	M	0.05	0.03	0.02	16.2	0.04	1.50
22	12 years old	F	0.13	0.81	17.40	4.29	9.54	2.85
23	61 years old	F	0.03	0.61	12.00	0.55	5.09	0.07
24	51 years old	M	0.17	3.21	18.90	2.14	7.69	0.19
25	47 years old	F	4.54	0.00	0.00	1.30	0.52	3.17
26	33 years old	F	14	0.00	0.00	3.06	2.31	8.27
27	45 years old	F	0	0.00	0.82	0.19	0.77	0.02
28	33 years old	M	1.62	0.00	0.00	0.30	0.02	1.03

F: Female; M: Male; ND: Not done.

Table 4. Nut allergic patients from Asturias.

No.	Specific IgE					
	Ara h 9	Cor a 8	Almond	Chestnut	Pistachio	Pinenut
1	0	0	0.21	0.73	0.01	0
2	0	0	0.83	0.06	0.14	0.06
3	0.06	0	2.02	10.1	0.04	0.02
4	0	0	0.19	0.66	0.01	0
5	0.33	0.25	0.19	0.41	0.03	0.13
6	0.12	0.08	0.1	1.12	2.12	0.18
7	0	0	0.01	0.04	0.02	0.01
8	0	0	0.1	0.16	0.15	0.01
9	0.13	8.83	0.26	2.91	0.28	0.4
10	27.1	12.1	7.98	5.46	0.91	3.19
11	0.06	0.04	0.43	0.57	0.45	0.44
12	3.43	1.26	0.85	3.02	1.66	0.62
13	ND	0	0.03	0.45	0.06	ND
14	1.62	0.94	0.34	1.35	0.1	0.05
15	0.69	0.22	0.49	0.19	0.08	0.02
16	0.06	0.13	0	0.03	0.02	0
17	8.76	1.36	1.09	1.09	0.17	0.1
18	0.05	0.02	1.6	6.95	0.11	0.1
19	5.44	0.77	0.93	0.2	0.11	0
20	4.71	9.38	1.1	1.39	0.34	0.09
21	0	0	0.21	0.1	0.03	0.02
22	0.08	0	0.29	2.28	5.65	0.07
23	0	0	0.35	0.4	0.18	0.07
24	0	0.07	0.1	0.79	0.09	0.18
25	2.25	1.23	0.27	0.07	0.14	0.99
26	7.54	5.99	2.9	2.51	0.15	0.05
27	0	0	0	0.17	0.16	0
28	1.31	0	0.05	0.5	0.08	0

F: Female; M: Male; ND: Not done.

Exclusion criteria were pregnancy or breastfeeding, extensive skin disease, serious psychiatric/psychological disturbances, contraindication to adrenaline treatment, alcohol or drug addiction, treatment with β -blockers, as well as any other condition which could either hamper protocol compliance or for which an oral challenge test is contraindicated [15].

2.2. Allergen-Specific IgE

Allergen-specific IgE was measured with the ImmunoCAP System FEIA (ThermoFisher Scientific AB, Uppsala, Sweden) following the manufacturer's recommendations. Venous blood samples were analyzed for IgE to nuts (peanut, hazelnut, almond, chestnut, pistachio, pine nut, and walnut), as well as to Pru p 3, Bet v 1, Phl p 12, Ara h 9, and Cor a 8.

2.3. Skin Prick-Prick Test

Skin prick tests were performed with a commercial battery (C.B.F. LETI, S.A; Tres Cantos, Spain) of nut extracts (almond, hazelnut, peanut, chestnut, sunflower seed, pine nut, walnut, pistachio) and prick-by-prick test with nuts (almond, hazelnut, peanut, chestnut, sunflower seed, pine nut, walnut, pistachio, and cashew), as well as a commercial battery (ALK-Abelló, Madrid, Spain) of pollen extracts, including *Lolium perenne*, *Betula verrucosa*, *Cupressus sempervirens*, *Platanus acerifolia*, *Artemisia vulgaris*, *Parietaria judaica*, *Salsola kali*, *Plantago lanceolata*, and *Olea europaea*. The ALK-Lancet needle (ALK-Lancet; ALK-Abelló, Horsholm, Denmark) was used for skin tests, which were performed according to EAACI guidelines [16]. Histamine phosphate at 10 mg/mL and normal saline solution were used as positive and negative controls, respectively. A weal with a diameter at least 3 mm larger than the negative control was considered a positive reaction.

2.4. Ethical Consent

The Fundación Jiménez Díaz Ethic Committee approved this study and written informed consent was obtained from all subjects.

2.5. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed with SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The qualitative variables were expressed as a percentage (without taking into account the missing cases). For quantitative variables, means and standard deviation (SD) were calculated, and for specific IgE and SPT results, medians and 25th (Q1) and 75th (Q3) percentiles were given. A χ^2 test was used for comparisons of frequencies. Values were considered significant at a p value of less than 0.05.

3. Results

A total of 77 patients (Table 5) with nut allergy took part in the study: 49 patients from Madrid and 28 from Asturias. Patients from Madrid had a mean age of 30 years: 46.9% female (23 out of the 49 patients) and 53.1% male (26 out of the 49 patients). The mean age in Asturias was 33.4 years: 42.9% female (12 out of the 28 patients) and 57.1% male (16 out of the 28 patients). Fifteen patients younger than eighteen years participated in the study (eight in Madrid and seven in Asturias).

Table 5. General characteristics of nut allergic patients.

Characteristics	Madrid	Asturias
Nut allergic patients	49	28
Age (mean \pm SD)	30.1 \pm 13.5	33.4 \pm 17.4
Sex	46.9% ♀/53.1% ♂	42.9% ♀/57.1% ♂
Nut Allergy		
Walnut	32 (65.5%)	14 (50.0%)
Hazelnut	28 (57.0%)	16 (57.1%)
Peanut	23 (46.9%)	13 (46.4%)
Almond	21 (42.0%)	3 (10.7%)
Symptoms		
OAS	13 (25.6%)	14 (50.0%)
SS	36 (73.5%)	14 (50.0%)

SD: standard deviation; OAS: Oral Allergy Syndrome; SS: Systemic Symptoms.

The study results were focused on hazelnut, peanut and walnut because of they were the three most frequent nuts eliciting allergy in both regions. The most frequent in Madrid was walnut (32 patients—65.3%), followed by hazelnut (28 patients—57.1%), peanut (23 patients—46.9%), and almond (21 patients—42%); while in Asturias the most frequent nut was hazelnut (16 patients—57.1%), followed by walnut (14 patients—50.0%), peanut (13 patients—46.4%), and almond (three patients—10.7%). Other nuts elicited allergy less frequently.

Respiratory symptoms affected 81.6% of the patients in Madrid and 56.6% in Asturias. All patients from Madrid had associated asthma and rhinitis while in Asturias rhinitis was the most prevalent respiratory symptom (47% rhinitis, 29% rhinitis and asthma, and 23.5% asthma).

In Madrid, 77.5% of the patients were sensitized to grass pollen and 47% to birch pollen, but 44% of the patients were sensitized to both. In Asturias, 57.1% and 42.8% were sensitized to grass pollen and birch pollen, respectively, although only 3.6% were sensitized to both grass and birch pollens in Asturias.

Interestingly, 36 of the 49 nut allergic patients (73.5%) from Madrid had systemic symptoms, while only 14 of the 28 patients (50.0%) studied in Asturias experienced systemic reactions, the difference being statistically significant ($p < 0.05$). 26.5% patients from Madrid and 50% from Asturias had isolated OAS symptoms ($p < 0.05$). In both regions walnut was the nut that elicited systemic symptoms in a larger

number of patients (22 patients in Madrid, seven patients in Asturias), while walnut elicited OAS in a larger number of patients from Madrid (10 patients) and hazelnut in Asturias (10 patients) (Table 6).

Table 6. Symptoms to nuts in patients from Madrid and Asturias.

Symptoms	Madrid		Asturias	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Hazelnut	28		16	
OAS	9	32.1%	10	62.5%
SS	19	67.9%	6	37.5%
Peanut	23		13	
OAS	5	21.7%	8	61.5%
SS	18	78.3%	5	38.5%
Walnut	32		14	
OAS	10	31.2%	7	50.0%
SS	22	68.8%	7	50.0%

On evaluating the pattern of sensitizations at the molecular level, we found important and interesting differences (Figures 1 and 2 and Table 7). In Madrid, sensitization to Pru p 3 was 71.4% followed by Ara h 9 (61.2%), Cor a 8 (44.9%), Phl p 12 (20.4%), and Bet v 1 (12%). In the patient group from Asturias, 46.4% were sensitized to Pru p 3, 42.9% to Bet v 1, 33.3% to Ara h 9, 30% to Cor a 8, and 14.3% to Phl p 12.

Percentage of sensitization in nut-allergic Patients

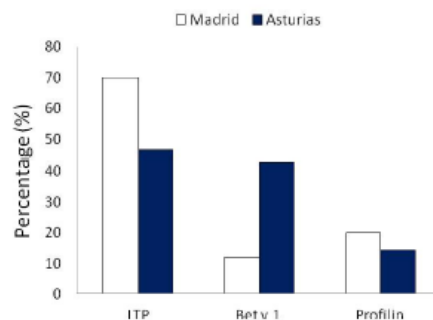


Figure 1. Differences in molecular pattern between Madrid and Asturias.

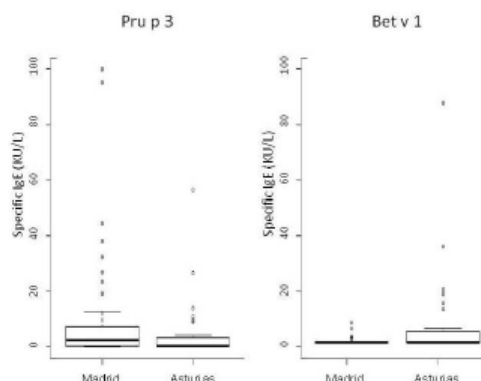


Figure 2. Specific IgE to LTP (Pru p 3) and Bet v 1 from both regions (median, Q1, and Q3).

Table 7. Differences in specific IgE levels to purified allergens between Madrid and Asturias (Median, Q1, Q3).

Allergen	Asturias	Madrid	<i>p</i>
Pru p 3	0.23 (0.04, 3.11)	2.40 (0.23, 7.58)	0.037
Phl p 12	0.03 (0.00, 0.06)	0.05 (0.01, 0.32)	0.205
Bet v 1	0.06 (0.00, 4.05)	0.01 (0.00, 0.04)	0.005

In the Madrid region, the percentage of sensitizations to LTP was higher than sensitizations to Bet v 1 (LTP 71.4%; Bet v 1 12%; $p < 0.05$). This pattern of molecular sensitization was repeated in patients allergic to walnut (78.0% LTP vs. 12.5% Bet v 1), hazelnut (78.6% LTP vs. 12.0% Bet v 1), and peanut (78.6% LTP vs. 8.7% Bet v 1). Surprisingly, this situation was very different with respect to analyzing the molecular pattern of sensitization to different nut allergies in Asturias. Bet v 1 was the predominant allergen involved among patients allergic to hazelnuts (56.2% to Bet v 1 vs. 31.2% to LTP), while LTP was the predominant allergen among patients allergic to peanut (61.5% to LTP vs. 30.8% to Bet v 1). Sensitization to walnut-allergic patients was equivalent to LTP (42.9%) and Bet v 1 (42.9%) (Figure 3).

Patterns of sensitization

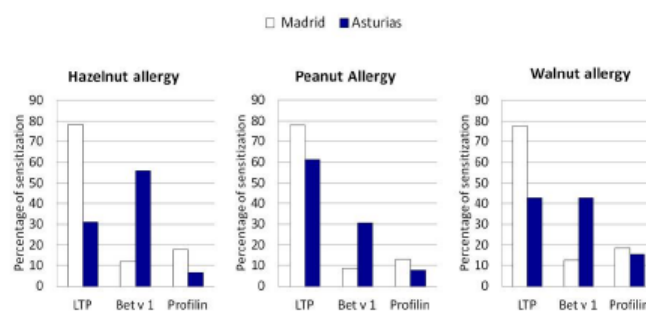


Figure 3. Differences in molecular pattern between Madrid and Asturias for patients allergic to hazelnut, peanut, or walnut.

On evaluating the frequency of allergy to nuts in Asturias (Figure 4) among patients sensitized to LTP, peanut (61.5%) was the most frequent nut-eliciting allergy, followed by walnut (46.1%) and then hazelnut (38.5%). On evaluating the frequency of allergy to nuts among patients sensitized to Bet v 1, hazelnut (75%) was the most frequent nut-eliciting allergy, followed by walnut (50%) and then peanut (33%).

Frequency of Nut Allergy in LTP or PR-10 sensitized patients



Figure 4. Frequency of nut allergies in patients sensitized to LTP and Bet v 1 from Asturias.

4. Discussion

This study found that walnut, hazelnut, and peanut were the most frequent nuts eliciting allergy in both regions of Spain. Despite this consistency, important differences in molecular pattern were seen not only between both regions, but also among different nuts in Asturias. The different molecular pattern was linked to the frequency of systemic symptoms suffered by patients.

Nut is a frequent cause of food allergy worldwide and is responsible for severe and near-fatal anaphylactic reactions [2]. Spain is probably one of the most typical examples of plant food allergy due to LTP sensitizations [10–13,17,18].

In this study we have evaluated the most frequent nut-eliciting allergy in two different regions from Spain. While, a distance of only 400 km separate them, Madrid has a continental climate and Asturias a maritime climate. An interesting result to be emphasized was that percentage of positive skin prick test results to birch pollen was similar in both regions (47% in Madrid and 42.8% in Asturias) without statistically significant differences. Curiously, on evaluating primary sensitizations, 12% of the patients from Madrid were sensitized to Bet v 1, while 42.8% were sensitized in Asturias, the difference being now statistically significant ($p < 0.05$). In this sense, we should remember that Madrid is an area with absence or low atmospheric level of birch tree pollen. The considerable percentage of patients sensitized to birch pollen in the Madrid area with a low percentage of sensitization to Bet v 1 have been previously reported [17].

Walnut, peanut, and hazelnut were the most frequent nuts eliciting allergy in both regions of Spain and, as a result, the study was focused on the analysis of differences of these three nuts. Walnut was more frequent in Madrid, but there were small differences among the tree nut prevalence in Asturias, with hazelnut being more frequent in this case but without significant statistical differences. These results were different from those reported by McWilliam et al., who analyzed the prevalence of nut allergy worldwide [3]. These differences might be explained by the allergen molecule involved in the allergic reactions, since, as previously stated, LTP was usually the major allergen involved in food allergy in Spain [10,12,13,18].

Another important result to be emphasized was the allergen pattern involved in the allergic reactions. On the one hand, there was a predominant pattern of LTP sensitization in the Madrid region,

which was in accordance with previously-reported studies [10,12,13,18]. This pattern was similar to the evaluated individual nuts (i.e., walnut, hazelnut and peanut). On the other hand, a mix of LTP and Bet v 1 sensitizations highlighted the pattern in Asturias region, however, the pattern changed depending on the nut evaluated. A predominant pattern of LTP was found in peanut allergy, Bet v 1 pattern in hazelnut allergy, and a mixed pattern (LTP and Bet v 1) to walnut allergy. These data are especially relevant because, to the best of our knowledge, this is the first time in which the predominant allergen family eliciting allergy in the same area changed from one nut to another. Nonetheless, we are conscious that it should be confirmed in studies with a higher number of patients.

Results of this report, along with other nut allergy studies from Spain [10–13,17,18], indicate that three different patterns of nut allergy coexist in Spain: LTP pattern, the most frequent pattern in most places for older children (>5 years old) and adult nut allergic patients; Bet v 1 pattern, which was significant in areas with patients sensitized to Bet v 1 dominated by hazelnut allergy; and, finally, storage protein pattern (2S albumin) in nut allergic children (<5 years old).

5. Conclusions

In this study we found that walnut, hazelnut, and peanut were the most frequent nuts eliciting allergy in both regions of Spain. Despite this, important differences in molecular pattern were appreciated not only between both regions, but also among nuts in Asturias. The different molecular pattern was linked to the frequency of anaphylaxis.

Acknowledgments: We would like to thank Oliver Shaw (Fundación IIS-Fundación Jiménez Díaz) for reviewing the manuscript for language-related issues. This work was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (PI13/00928 and PI16/00888) and RETIC ARADYAL (RD16/0006/0003, RD16/0006/0013, RD16/0006/0014 and RD16/0006/0022), co-supported by FEDER grants.

Author Contributions: J.C.-H. conceived and designed the experiments; E.H.-D., E.G.-M. and M.d.l.H. collected data in Madrid; J.A. collected data in Asturias; C.P.-V., V.E., M.V. and A.D.-P. analysed the data; J.C.-H. and E.H.-D. wrote the manuscript. All authors reviewed and edited the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The author declares that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

1. Brown, S.G.A.; Kemp, S.F.; Lieberman, P.L. Anaphylaxis. In *Middleton's Allergy: Principles and Practice*, 8th ed.; Adkinson, N.F., Jr., Bochner, B.S., Burks, A.W., Busse, W., Holgate, S., Lemanske, R., O'Hehir, R., Eds.; Elsevier Saunders: Philadelphia, PA, USA, 2014; pp. 1237–1259.
2. Shah, E.; Pongracic, J. Food-induced anaphylaxis: Who, what, why, and where? *Pediatr. Ann.* **2008**, *37*, 536–541. [[PubMed](#)]
3. McWilliam, V.; Koplin, J.; Lodge, C.; Tang, M.; Dharmage, S.; Allen, K. The Prevalence of Tree Nut Allergy: A Systematic Review. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **2015**, *15*, 54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Togias, A.; Cooper, S.E.; Acebal, M.L.; Assa'ad, A.; Baker, J.R., Jr.; Beck, L.A.; Block, J.; Byrd-Bredbenner, C.; Chan, E.S.; Eichenfield, L.F.; et al. Addendum guidelines for the prevention of peanut allergy in the United States: Report of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases-sponsored expert panel. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2017**, *139*, 29–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Roux, K.H.; Teuber, S.S.; Sathe, S.K. Tree nut allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2003**, *131*, 234–244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Willison, L.N.; Sathe, S.K.; Roux, K.H. Production and analysis of recombinant tree nut allergens. *Methods* **2014**, *66*, 34–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Bublin, M.; Breiteneder, H. Cross-reactivity of peanut allergens. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **2014**, *14*, 426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Luengo, O.; Cardona, V. Component resolved diagnosis: When should it be used? *Clin. Trans. Allergy* **2014**, *4*, 28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

9. Vereda, A.; Sirvent, S.; Villalba, M.; Rodríguez, R.; Cuesta-Herranz, J.; Palomares, O. Improvement of mustard (*Sinapis alba*) allergy diagnosis and management by linking clinical features and component-resolved approaches. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2011**, *127*, 1304–1307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Vereda, A.; van Hage, M.; Ahlstedt, S.; Ibañez, M.D.; Cuesta-Herranz, J.; van Odijk, J.; Wickman, M.; Sampson, H.A. Peanut allergy: Clinical and immunologic differences among patients from 3 different geographic regions. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2011**, *127*, 603–607. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Fernández-Rivas, M.; Bolhaar, S.; González-Mancebo, E.; Asero, R.; van Leeuwen, A.; Bohle, B.; Ma, Y.; Ebner, C.; Rigby, N.; Sancho, A.L.; et al. Apple allergy across Europe: How allergen sensitization profiles determine the clinical expression of allergies to plant foods. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2006**, *118*, 481–488. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Hansen, K.S.; Ballmer-Weber, B.K.; Sastre, J.; Lidholm, J.; Andersson, K.; Oberhofer, H.; Lluch-Bernal, M.; Ostling, J.; Mattsson, L.; Schocker, F.; et al. Component-resolved in vitro diagnosis of hazelnut allergy in Europe. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2009**, *123*, 1134–1141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Datema, M.R.; Zuidmeer-Jongejan, L.; Asero, R.; Barreales, L.; Belohlavkova, S.; de Blay, F.; Bures, P.; Clausen, M.; Dubakiene, R.; Gislason, D.; et al. Hazelnut allergy across Europe dissected molecularly: A EuroPrevall outpatient clinic survey. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2015**, *136*, 382–391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Comité de Reacciones Adversas a Alimentos; Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica. Metodología diagnóstica en alergia a alimentos. *Alergol. Inmunol. Clin.* **1999**, *14*, 50–62.
15. Bindslev-Jensen, C.; Ballmer-Weber, B.K.; Bengtsson, U.; Blanco, C.; Ebner, C.; Hurihane, J.; Knulst, A.C.; Moneret-Vautrin, D.A.; Nekam, K.; Niggemann, B.; et al. Standardization of food challenges in patients with immediate reactions to foods—Position paper from the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy* **2004**, *59*, 690–697. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Sub-Committee on Skin Tests of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. Skin tests used in type I allergy testing: Position paper. *Allergy* **1989**, *44* (Suppl. 10), 1–59.
17. Cuesta-Herranz, J.; Barber, D.; Blanco, C.; Cistero-Bahíma, A.; Crespo, J.F.; Fernández-Rivas, M.; Fernández-Sánchez, J.; Florido, J.F.; Ibañez, M.D.; Rodríguez, R.; et al. Differences among pollen-allergic patients with and without plant food allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2010**, *153*, 182–192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. García-Blanca, A.; Aranda, A.; Blanca-Lopez, N.; Perez, D.; Gomez, F.; Mayorga, C.; Torres, M.J.; Diaz-Perales, A.; Perkins, J.R.; Villalba, M.; et al. Influence of age on IgE response in peanut-allergic children and adolescents from the Mediterranean area. *Pediatr. Allergy Immunol.* **2015**, *26*, 497–502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Los estudios realizados en este trabajo de investigación han sido posibles gracias a la financiación pública concedida por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) en el marco del Proyecto FIS titulado “Análisis de patrones clínicos y moleculares y búsqueda de biomarcadores para optimizar el manejo de los pacientes con alergia a frutos secos” con referencia PI13/00928.